

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Br.
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Otto Westphal
vorgelegt über das
Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Rudolf Rott

**Die immunogene Form des Enterobacterial Common Antigen
Untersuchungen zur Lokalisation in der Zellhülle
und zur Bindung an Lipopolysaccharid von E.coli
R1- und R4-Mutanten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinär-medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Jesko Rinno
Tierarzt aus Stolp

Gießen 1979

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Br.
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Otto Westphal
vorgelegt über das
Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Rudolf Rott

**Die immunogene Form des Enterobacterial Common Antigen
Untersuchungen zur Lokalisation in der Zellhülle
und zur Bindung an Lipopolysaccharid von E.coli
R1- und R4-Mutanten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinär-medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen



eingereicht von
Jesko Rinno
Tierarzt aus Stolp

Gießen 1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin und Tierzucht in Gießen

Dekan: Prof. Dr. E. Weiß

Berichterstatter: Dr. H. Mayer, Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 3.4.1979



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kiss, P., Rinno, J., Golecki, J., Schmidt, G., Mayer, H.:
Enterobacterial common antigen. II. Studies on the immunogenic form.
In: Functions of microbial membranes. Symposium Tübingen, Abstract, 1977.

Kiss, P., Rinno, J., Schmidt, G., Mayer, H.:
Structural studies on the immunogenic form of the enterobacterial common antigen.
Eur.J.Biochem. 88: 211-218, 1978

Mayer, H., Ruschmann, E., Rinno, J.:
Differential effect of heat and acid-treatment on the immunogenicity of bacterial antigens: common antigen, lipoprotein, lipid A and R-antigen.
Liblice Meeting, Abstract 1978.

Rinno, J., Golecki, J., Schmidt, G., Mayer, H.:
On the localization of the enterobacterial common antigen.
Liblice Meeting, Abstract, 1978.

Herrn Prof. Dr. Otto Westphal danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg.

Herrn Dr. Hubert Mayer danke ich für die Überlassung des Themas, ganz besonders aber für die Leitung dieser Dissertation, für seine vielen Anregungen und Diskussionen und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. J. R. Golecki danke ich für die Durchführung der Gefrierätzung und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Den Herren Prof. Dr. D. Hammer, Dr. P. Kiss, Dr. W. Falk und Dr. U. Feige danke ich für Ratschläge und Hilfen, die die Durchführung und den Fortgang der Arbeit gefördert haben.

Den Herren Prof. Dr. H. Martin, Dr. J. Gmeiner und Dr. G. Schmidt danke ich für die Züchtung und Bereitstellung der Bakterien.

Frau C. Vogel danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen.

Frau I. Strom danke ich für die Photoarbeiten.

Frau S. Agueras danke ich für die druckreife Ausfertigung dieser Dissertation.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

A.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
B.	<u>EINLEITUNG</u>	2
1.	Die Zellhülle gram-negativer Bakterien	2
2.	Antigene in der gram-negativen Zellhülle	5
2.1.	O-Antigene/Lipopolysaccharide	6
2.2.	Hauptproteine	9
2.3.	Lipoprotein	10
2.4.	K-Antigene/Kapselpolysaccharide	10
3.	Enterobacterial Common Antigen (ECA)	11
4.	Genetische Determinierung von ECA	16
5.	Die molekulare Basis der ECA-Immunogenität	21
6.	Problemstellung und Ziel der Arbeit	22
C.	<u>ERGEBNISSE</u>	27
1.	<u>Immunologische Eigenschaften von ECA</u>	27
1.1.	Einleitung	27
1.2.	ECA-spezifische Titer nach Immunisierung mit Bakteriensuspensionen	27
1.3.	Weitere Untersuchungen zur Antikörperantwort gegen ECA im Kaninchen	33
1.4.	Auftrennung von monospezifischen ECA-Antiseren in die IgM- und IgG-Fractionen	37
1.5.	Zusammenfassung	43

2.	<u>Lokalisation des immunogenen ECA</u>	43
2.1.	Einleitung	43
2.2.	Kupplung von IgG an Ferritin über Glutardialdehyd	44
2.3.	Auswahl der Bakterienstämme zur Beladung mit markierten Antikörpern	46
2.4.	Beladung von Bakterien mit markierten Antikörpern	47
2.5.	Elektronen-mikroskopische Untersuchungen von Ferritin-beladenen Bakterien	49
2.6.	Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen von Fluoreszein-beladenen Bakterien	62
2.7.	Markierungsuntersuchungen von Sphäroplasten und Protoplasten von <u>Proteus mirabilis</u> -Bakterien	69
2.8.	ECA-Gehalt von <u>Proteus mirabilis</u> Sphäro- und Protoplasten	78
2.9.	Zusammenfassung	79
3.	<u>Radioaktive Markierung von ECA und dessen Isolierung</u>	80
3.1.	Einleitung	80
3.2.	Bakterienwachstum in Anwesenheit von radioaktivem [^{14}C]-N-Acetyl-D-glucosamin	81
3.3.	PCP-Extraktion zur Isolierung der radioaktiv-markierten R-Lipopolysaccharide	82
3.4.	Essigsäure-Degradierung der R-Lipopolysaccharide zur Isolierung der Core-Oligosaccharide	85
3.5.	Hochspannungs-Papierelektrophoretische Analyse zum Nachweis von Mannosaminuronsäure	87
3.6.	Zusammenfassung	93

4.	<u>LPS-, ECA- und Lipid A-Titer in Kaninchenserum gegen Essigsäure-degradierte Bakterien</u>	94
4.1.	Einleitung	94
4.2.	LPS-, ECA- und Lipid A-Titer in Seren nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten Bakterien	94
4.3.	Zusammenfassung	101
D.	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION</u>	102
E.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	111
1.	Nährmedien	111
2.	Puffer	111
3.	Bakterien	115
3.1.	Stämme	115
3.2.	Kultivierung	116
3.3.	in <u>vivo</u> -Markierung mit N-Acetyl-[1- ¹⁴ C]-D-glucosamin	116
3.4.	Wachstumsmessung	117
4.	Extraktionsmethoden	117
4.1.	Phenol/Wasser - Extraktion	117
4.2.	PCP-Verfahren	117
4.3.	Kombination	117
5.	Analytische Methoden	117
5.1.	Hydrolyse-Bedingungen	117

5.2.	Hochspannungs-Papierelektrophorese	118
5.3.	Anfärbungen	119
5.4.	Radiochromatogramm	119
5.5.	Radioaktivitätsmessung	120
6.	Serologische Methoden	120
6.1.	Immunisierungen	120
6.2.	Serumherstellung	121
6.3.	Serumabsorption	121
6.4.	Serumchromatographie über Sephadex G 200	122
6.5.	Alkalisierung von Lipopolysaccharid	122
6.6.	Passive Hämagglutination	122
6.7.	Hämagglutinationshemmtest	123
6.8.	Passive Hämolyse	124
6.9.	IgM-Antikörper-Inaktivierung	124
6.10.	Immunpräzipitation	125
7.	Markierungsmethoden	125
7.1.	Proteinbestimmung mit Biuret	125
7.2.	Kupplung von Ferritin und Antikörper	126
7.3.	Chromatographie über Sepharose 4 B	127
7.4.	Beladung von Bakterien mit Ferritin-IgG-Konjugaten	128
7.5.	Gefrierätz-Technik	129
7.6.	Beladung von Bakterien mit Fluoreszein-gekuppelten Antikörpern	131

F.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	132
----	-----------------------------	-----

ABKÜRZUNGEN

ACL	=	antigen carrier lipid
ATA	=	anodisch wanderndes thermolabiles Antigen
b	=	Vesikel mit Material der äußeren Membran (blebs)
C	=	Kohlenstoff
CE	=	Oberfläche der Zellhülle (cell envelope)
CM	=	Oberfläche der cytoplasmatischen Membran (cytoplasmic membrane)
DTT	=	Dithiothreitol
ECA	=	enterobacterial common antigen
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
EM	=	Elektronen-Mikroskop
Gal	=	Galaktose
Glc	=	Glucose
GlcN	=	Glucosamin
GlcNAc	=	N-Acetyl-glucosamin
HAc	=	Essigsäure
Hep	=	Heptose
HVE	=	high voltage electrophoresis
IgG	=	Immunglobulin G
IgM	=	Immunglobulin M
KDO	=	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
LPS	=	Lipopolysaccharid
ManNUA	=	Mannosaminuronsäure
ManNAcUA	=	N-Acetyl-mannosaminuronsäure
NAD ⁺	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OM	=	Oberfläche der äußeren Membran (outer membrane)

P	=	Phosphor
PBS	=	phosphate buffered saline
PCP	=	Phenol/Chloroform/Petroläther
PF	=	Protoplasmatische Bruchhälfte (protoplasmic fracture face)
pHA	=	passive Hämagglutination
pHL	=	passive Hämolys
PN	=	Phosphoryläthanolamin
PPN	=	Pyrophosphoryläthanolamin
PPO	=	2,5-Diphenyloxyl
Pt/C	=	Platin/Kohlenstoff
TCA	=	Trichloressigsäure
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP-GlcNAc	=	Uridindiphosphat-N-acetyl-glucosamin
UDP-ManNAc	=	Uridindiphosphat-N-acetyl-mannosamin
UDP-ManNAcUA	=	Uridindiphosphat-N-acetyl-mannosaminuronsäure
UV	=	ultraviolett
VBS	=	veronal buffered saline
VS	=	Vollserum

A. ZUSAMMENFASSUNG

Immunisierungen von Kaninchen mit lebenden Bakterien, die immunogenes ECA in der Zellhülle besitzen, ergeben die höchsten ECA-Titer in der passiven Hämagglutinationsreaktion. Diese Titer bleiben nach Absorption mit ECA-freien Bakterien erhalten. IgM-Antikörper bilden den Hauptanteil am ECA-Titer, während der IgG-Antikörperanteil auch nach längeren Immunisierungen niedrig bleibt.

An Ferritin gekuppelte IgG-Antikörper gegen ECA zeigen in EM-Untersuchungen, daß ECA ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer E.coli-Bakterien ist. Es kommt weder auf der inneren Seite der Zellhülle noch in der cytoplasmatischen Membran vor.

Ergänzende serologische Untersuchungen von Proto- und Sphäroplasten von Proteus mirabilis zeigen, daß in Überständen erhitzter Bakteriensuspensionen nur bei Sphäroplasten geringe Mengen an ECA in den Resten der äußeren Membran vorkommen.

Durch Untersuchungen von immunogenem ECA, dessen Zuckerbausteine während der Bakterienkultivierung radioaktiv markiert wurden, kann gezeigt werden, daß ECA bei E.coli-Bakterien kovalent am Core-Oligosaccharid gebunden ist. Als Bindungsbereich kommt der Hexoseteil des Cores in Betracht.

Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Immunisierungsversuche mit Essigsäure-degradierten Bakteriensuspensionen. Die ECA- und R-Titer sinken nach der Degradierung stark ab, während Lipid A-Titer erst nach Degradierung auftreten. Das reziproke Verhalten der Immunogenität von ECA und R-Antigenen einerseits und Lipid A andererseits ist ein weiteres Indiz dafür, daß immunogenes ECA am R-Core kovalent gebunden ist.

B. EINLEITUNG

1. Die Zellhülle gram-negativer Bakterien

Die bakterielle Zellhülle stellt eine funktionelle biologische Einheit dar, die unter anderem Schutz-, Transport- und Biosynthesefunktionen erfüllt. Ihr chemischer Aufbau und ihre biologische Funktion sind seit Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Gram-negative Bakterien besitzen eine 150-350 nm dicke, dreischichtige Zellhülle (7,11) (Abb. 1).

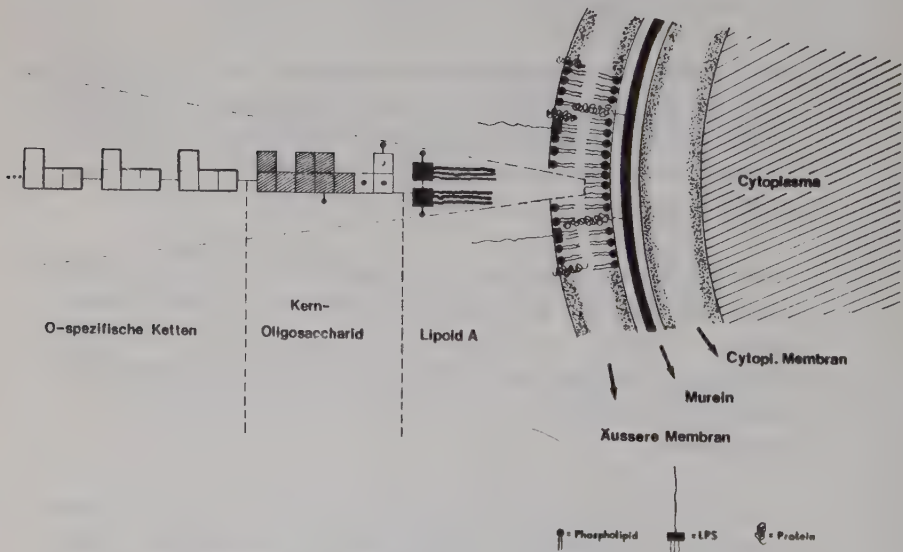


Abb. 1: Aufbau der Zellhülle von Salmonella typhimurium modifiziert nach Weckesser et al. (141).

Sie ist aufgebaut aus der:

cytoplasmatischen Membran	(inner membrane)
der Mureinschicht (Peptidoglycan-Schicht)	(rigid layer)
und der äußeren Membran.	(outer membrane)

Oft ist der äußeren Membran noch eine als Kapsel oder Schleim bezeichnete Schicht aufgelagert (99,151).

Die Cytoplasmamembran erscheint im Elektronenmikroskop als Doppelschicht. Sie ist die osmotische Barriere der Zelle und selbst für kleinste Moleküle nicht ohne weiteres passierbar. Für den notwendigen Stoffaustausch enthält sie enzymatische Transportsysteme (17,101). Andere in der Cytoplasmamembran lokalisierte Enzyme sind Teil der Atmungskette oder führen die Biosynthese von Murein- und Lipopolysaccharidvorstufen durch. Plasmolyse und nachfolgende elektronenoptische Untersuchungen ließen Verbindungsstellen zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran erkennen (6). Diese Anheftungspunkte (adhesion points) bilden vermutlich die Kanäle, durch die die Bakteriophagen-DNA in die Bakterienzelle gelangt. Sie stellen wahrscheinlich auch die Exportstellen für neu synthetisiertes Lipopolysaccharid dar (90,100). Pro μ^2 Zelloberfläche eines Bakteriums sind etwa 300 solcher Adhäsionspunkte vorhanden (89). Von ihnen aus verteilt sich neugebildetes LPS in wenigen Minuten über die ganze Bakterienoberfläche.

Die Mureinschicht stellt ein netzartiges relativ starres Riesemolekül (Sacculus) dar, das der Bakterienzelle ihre individuelle Gestalt gibt (9). Diese Schicht der Bakterien besteht chemisch im wesentlichen aus N-Acetylaminozuckern (D-Glucosamin, D-Muraminsäure) und einigen charakteristischen Aminosäuren (D- und L-Alanin, D-Glutaminsäure, Diaminopimelinsäure und Glycin) (132). Während bei gram-positiven Bakterien das Murein eine sehr dicke Schicht bildet, die 50-90% des Zellmaterials ausmacht, ist das Mureinnetz der gram-negativen Bakterien einschichtig und macht ca. 10% der Zellwand aus (132). Ein Teil des in der Zellwand

vorkommenden Lipoproteins ist mit dem Murein kovalent verknüpft (s. Abb. 2).

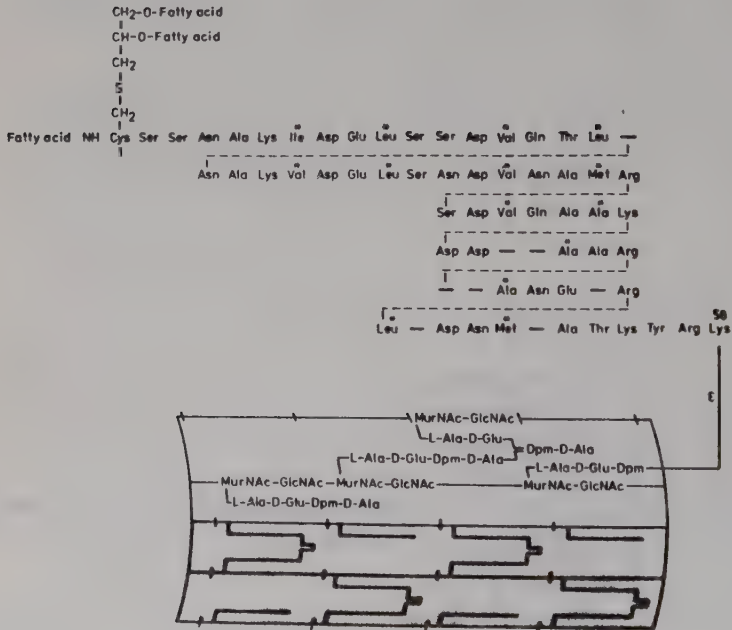


Abb. 2 Schema des Murein-Lipoproteinkomplexes der gram-negativen Zellwand nach Braun und Hantke (9).

GlcNAc : 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose

MurNAc : 2-Acetamido-2-desoxy-O-(D-carboxyäthyl)-D-glucose

Dadurch entsteht bei E.coli und vermutlich bei vielen anderen gram-negativen Bakterien ein dreidimensionales starres Gerüst, und es ist möglich, daß Lipoprotein an der Verankerung der äußeren Membran mitwirkt (10). Lipoprotein kommt aber auch in freier Form, nicht an Murein gebunden, vor (8,30,44).

Die äußere Membran besteht zu etwa 50% aus Protein, zu 20-40% aus Lipopolysaccharid und zu etwa 15% aus Phospholipid (113). Sie stellt eine hydrophobe Permeabilitätsbarriere dar, die das Eindringen von Makromolekülen und das Austreten von periplasmatischen Enzymen und Proteinen verhindert (97). Kleine Moleküle können durch hydrophile Poren (13,92) passiv in die Zelle eindringen. Aktive Transportsysteme existieren für viele Substanzen, z.B. für den Maltose- (124) oder für den Eisentransport (32). Die Innenseite der Membran wird von Phospholipiden und Proteinen gebildet (51,129). Die Beweglichkeit der einzelnen Bestandteile, d.h. ihre Mobilität in der Zellwand, ist temperaturabhängig (91). Lipopolysaccharide und Proteine bilden vornehmlich die äußere Seite der Membran.

Durch geeignete Behandlung mit Enzymen oder durch osmotischen Schock können äußere Membran und Mureinschicht voneinander gelöst werden. Durch Penicillin-Behandlung entstehen Sphäroplasten, die zwar noch eine intakte Mureinschicht haben, denen aber der größte Teil der äußeren Membran fehlt.

Der periplasmatische Raum enthält Enzyme, sowie Transport- und Bindungsproteine (48,78,93).

2. Antigene in der gram-negativen Zellhülle

In der Zellhülle kommen bestimmte Makromoleküle vor, die immunogene bzw. antigene Eigenschaften besitzen. Diese Antigene lassen sich nach ihrer Chemie und ihren serologischen Eigen-

schaften zu verschiedenen Antigenklassen zusammenfassen. Da sie bei häufig gleicher Grundstruktur in der Detailstruktur stark variieren, sind sie für die Bakterienklassifizierung von besonderer Bedeutung (Serotypen). Einige dieser Antigengruppen sollen ausführlicher dargestellt werden.

2.1. O-Antigene / Lipopolysaccharide

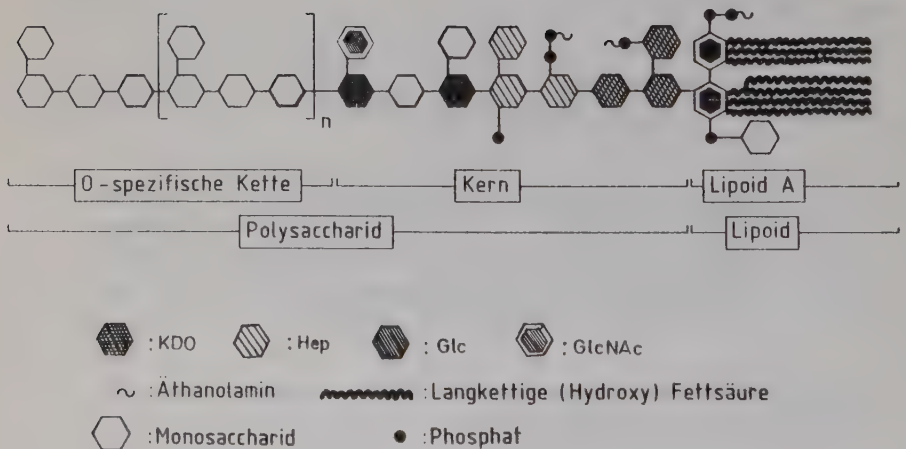


Abb. 3: Schematische Struktur eines Salmonella-Lipopolysaccharides modifiziert nach Rietschel (1978), unveröffentlicht.

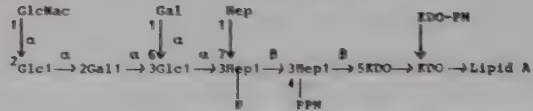
LPS ist ein amphipathisches Makromolekül mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Teilstruktur. Der hydrophobe Anteil wird von Lipid A gebildet, welches in der äußeren Membran verankert ist. Die Verankerung von Lipopolysacchariden (LPS) in der äußeren Zellmembran ist aus Abb. 1 ersichtlich. Lipid A ist Träger der endotoxischen Eigenschaften (letale Toxizität, Pyrogenität) (22). Lipopolysaccharide kommen in nahezu allen gram-negativen Bakterien vor (66). Sie stellen häufig Bakteriophagen-Rezeptoren dar und sind für zahlreiche biologische Eigenschaften verantwortlich (65). Sie wirken immunogen, antigen, mitogen, verursachen Fieber und allergische Reaktionen, um nur einige Wirkungen zu nennen.

Lipopolysaccharide sind bei allen gram-negativen Bakterien nach dem gleichen Bauprinzip zusammengesetzt (Abb. 3) (66). Der hydrophile Teil ragt über die äußere Membran hinaus und enthält die Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden (serologische Determinanten). Dieser Polysaccharidteil wird in die O-spezifischen Ketten und das Kern- oder Core-Oligosaccharid unterteilt, die auch unter getrennter genetischer Kontrolle stehen. Die chemische Zusammensetzung der O-Ketten ist für die serologische Klassifizierung vieler gram-negativer Bakterien verantwortlich (Enterobacteriaceae) (52). Sie setzen sich aus Wiederholungseinheiten zusammen, die selbst wiederum aus 3 - 6 Monosacchariden aufgebaut sind. Die O-Ketten unterliegen einer großen Variabilität, während die Core-Strukturen und besonders der Lipid A - Teil relativ invariabel sind. Der R-Core besteht im allgemeinen aus einem Hexosepentasaccharid und aus einem Heptosetrisaccharid. Über ein KDO-Trisaccharid ist das R-Lipopolysaccharid an Lipid A gebunden. R-Mutanten, die die O-spezifischen Ketten verloren haben, können spontan oder durch mutagene Behandlung entstehen. Während bei Salmonella nur ein einziger R-Core-Typ bekannt ist, sind von E.coli und Shigella bisher fünf verschiedene Core-Typen beschrieben worden, deren Strukturen in Abb. 4 vorgestellt sind.

Core-Typ Literaturhinweise und Struktur des LPS

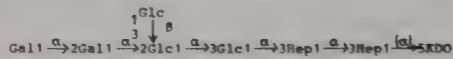
Salmonella

34,64



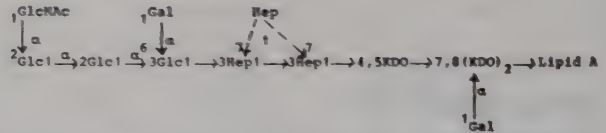
E. coli R1

18



E. coli R2

29,118

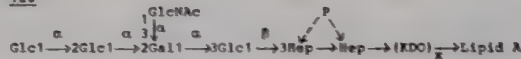


E. coli R3

85,116,117

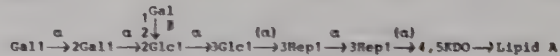
Shig. flexneri

128



E. coli R4

19



E. coli K-12

82,106

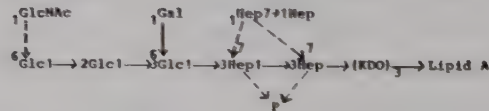


Abb. 4: Die chemischen Strukturen der Core-Typen bei verschiedenen Enterobacteriaceen modifiziert nach Feige (18)

2.2. Hauptproteine

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Polypeptiden in Zellwandextrakten gram-negativer Bakterien nachgewiesen worden. Sie stellen einen großen Anteil der Gesamtproteinmenge der äußeren Membran dar und werden deshalb als Hauptproteine bezeichnet (1,39,40,67,122,123). Ihre Bedeutung als Antigene ist in zunehmendem Maße Gegenstand von detaillierten Untersuchungen, da zahlreiche Proteine vielen Bakterienarten gemeinsam sind (5,12,125) und in einigen Fällen Protein-Antigene nach Injektion in Versuchstiere Schutz gegen homologe und heterologe Bakterieninfektionen vermitteln konnten. Bisher wurden aber nur drei Proteinantigene der äußeren Membran unter nicht-denaturierenden Bedingungen präparativ isoliert und serologisch charakterisiert. Das am besten untersuchte (Murein-) Lipoprotein wird später ausführlich dargestellt werden. Ein Phospholipoprotein aus Pseudomonas facilis (110,111,112) ist für Antikörper zugänglich und kommt, wie Agglutinationsversuche zeigten, ubiquitär in gram-negativen und zum Teil auch in gram-positiven Bakterien vor.

Im vergangenen Jahr wurde ein mit LPS komplexierendes (k-) Protein aus Salmonella minnesota R 595 (25) isoliert. Es ist im Kaninchen immunogen, sein Molekulargewicht liegt bei 15 000 und der isoelektrische Punkt bei pH 10.3. Es komplexiert leicht mit Lipopolysaccharid, wobei wahrscheinlich ionischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen vom Lipid A und den kationischen Gruppen des k-Proteins der entscheidende Anteil an der Bindung zukommt. Das k-Protein ist gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt und für spezifische Antikörper erreichbar.

2.3. Lipoprotein

Das Braun'sche Lipoprotein kommt zu zwei Dritteln frei in der äußeren Membran und zu einem Drittel kovalent an Murein gebunden vor (8,44). Es spielt bei der Zellteilung eine wichtige Rolle (6,45,135,143). Bei R-Mutanten reicht es so weit durch die äußere Membran (8,44), daß es von Lipoprotein-spezifischen Antikörpern erreicht werden kann. Es ist bei gram-negativen Bakterien weit verbreitet. Lipoprotein-spezifische Antikörper konnten sogar in Antiseren gegen einige photosynthetische Bakterien (Rhodospirillaceae) nachgewiesen werden (8,15). Die Primärstruktur des Lipoproteins ist in Abb. 2 gezeigt.

2.4. K-Antigene / Kapselpolysaccharide

K-Antigene sind von E.coli und Klebsiella bekannt. Sie besitzen ein hohes Molekulargewicht und bestehen häufig aus sauren Zuckerkomponenten (Uronsäuren, Zuckerphosphaten). Sie lassen sich mit Ruthenium-Rot anfärben (130) und werden so im Elektronenmikroskop sichtbar. K-Antigene beeinflussen die Virulenz und Pathogenität vieler Bakterien (27,41,50) und verhindern die Agglutinabilität mit O-spezifischen Antikörpern. Ihrer Thermolabilität nach werden sie in drei Gruppen eingeteilt (53): Die K-Antigene der thermolabilen Gruppe L werden durch einstündiges Erhitzen auf 60° zerstört. Zu den Gruppen A und B zählen die thermostabileren K-Antigene.

K-Polysaccharide der Gruppe A können durch Mutation leicht verloren gehen (akapsuläre Mutanten). Sie kommen im allgemeinen nur gemeinsam mit dem 08 und dem 09 Antigen von Escherichia coli vor (46). K-Antigene der B- und L-Gruppen kommen dagegen in Kombination mit allen anderen O-Antigenen vor.

3. Enterobacterial Common Antigen (ECA)

1962 wurde von C. Kunin ein bisher übersehenes, allen Enterobacteriaceen gemeinsames Antigen beschrieben (60), das er als "Enterobacterial Common Antigen (CA)" bezeichnete. Dieses heute meistens als ECA bezeichnete Antigen wurde im Verlauf von Untersuchungen über Kreuzreaktionen der verschiedenen E.coli O-Serotypen in der passiven Hämagglutination entdeckt. Antiseren gegen einige wenige O-Serotypen, vor allem aber Antiseren gegen E.coli O14 waren in der Lage, Erythrozyten, die mit Überständen fast aller E.coli-Serotypen beladen waren, zu agglutinieren. Spätere Untersuchungen zeigten, daß O14-Antiserum auch mit Überständen von Salmonellen, Proteus, Klebsiella etc., d.h. mit anderen Enterobacteriaceen, in der passiven Hämagglutinationsreaktion zu reagieren vermag. Durch Absorption von O14-Antiseren mit Antigen-Extrakt-beladenen Erythrozyten konnte aus diesen Antiseren die kreuzreagierende Komponente eliminiert werden. Dabei blieb aber die O14-Spezifität vollständig erhalten (3,59). E.coli O14-Antiserum enthält also zwei voneinander unabhängige Spezifitäten: die O14-Spezifität und eine allen getesteten Enterobacteriaceen gemeinsame Spezifität. Das diese Spezifität verursachende Enterobacterial Common Antigen (ECA) ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und soll im Folgenden näher besprochen werden.

ECA-haltig

ECA-frei

Enterobacteriaceae

Escherichia

Edwardsiella

Citrobakter (einschl. Levinea)

Salmonella

Shigella

Klebsiella

Enterobakter

Serratia

Proteus (Yersinia)

Erwinia

Erwinia chrysanthemi

Vibrionaceae

Plesiomonas shigelloides (15 Stämme)

Aeromonas hydrophila (1 Stamm)

Aeromonas

Vibrio

Flavobakterium

Haemophilus

Pasteurella

Rhodospirillaceae (11 Stämme)

Nitrobacteriaceae (1 Stamm)

Tabelle 1: Verteilung von ECA in gram-negativen
Bakterien (86)

Die Verbreitung des ECA bei gram-negativen Bakterien ist in Tabelle 1 gezeigt. Mit Ausnahme von zwei Stämmen (Plesiomonas shigelloides und Aeromonas hydrophila), die den Vibrionaceae zugehören, sind alle ECA-haltigen Stämme der Familie der Enterobacteriaceae zugehörig. Umgekehrt enthalten auch (mit Ausnahme von Erwinia chrysanthemi) alle Enterobacteriaceae dieses gemeinsame Antigen.

Die Reindarstellung des ECA aus Salmonella montevideo SH 94 und seine chemische Identifizierung ist kürzlich beschrieben worden (76). Die Isolierung von ECA durch Phenol/Wasser-Phenol/Chloroform/Petroläther-Extraktion (23) ist in Abb. 5 dargestellt. ECA ist ein Heteropolysaccharid, das zu geringem Prozentsatz mit

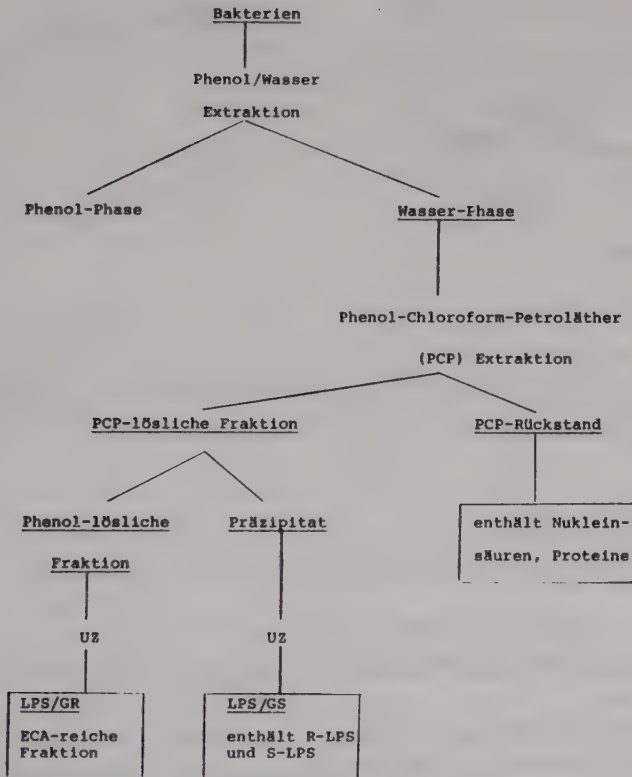


Abb. 5: Schema der kombinierten Phenol/Wasser-Phenol/Chloroform/Petroläther-Extraktionsmethode modifiziert nach Männel (75).

UZ = Ultrazentrifugation (105 000 x g; 4 h).

Palmitin- und Essigsäure verestert ist (76), worauf seine amphiphilen Eigenschaften beruhen. Tabelle 2 gibt die chemische Zusammensetzung von ECA wieder.

Aminozucker insgesamt	45 - 50	%
(<u>D</u> -Glucosamin)	(23 - 25)	%
(<u>D</u> -Mannosaminuronsäure)	(23 - 25)	%
N-Acetyl-Gruppen	11.7	%
O-Acetyl-Gruppen	1.3	%
Fettsäuren insgesamt	2.5	%
Palmitinsäure	2.0	%
C _{18:1}	($\frac{-}{+}$)	%
Phosphatgruppen	0.47	%
Neutralzucker	-	
Aminosäuren	-	
Total	70	%
Wasserlöslichkeit	(0.3)	%

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des ECA von Salmonella monteideo SH 94, modifiziert (76)

N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-mannosaminuronsäure bilden in alternierender Reihenfolge eine 1,4 verknüpfte lineare Kette, die aus etwa 8 - 10 Zuckereinheiten besteht. Das Molekulargewicht des nicht aggregierten ECA beträgt etwa 2700 (76). In wässrigen Lösungen bildet ECA größere Aggregate und Micellen. Isoliertes ECA ist nicht homogen, denn in der Immunelektrophorese ist eine geschwungene Präzipitationslinie zu beobachten.

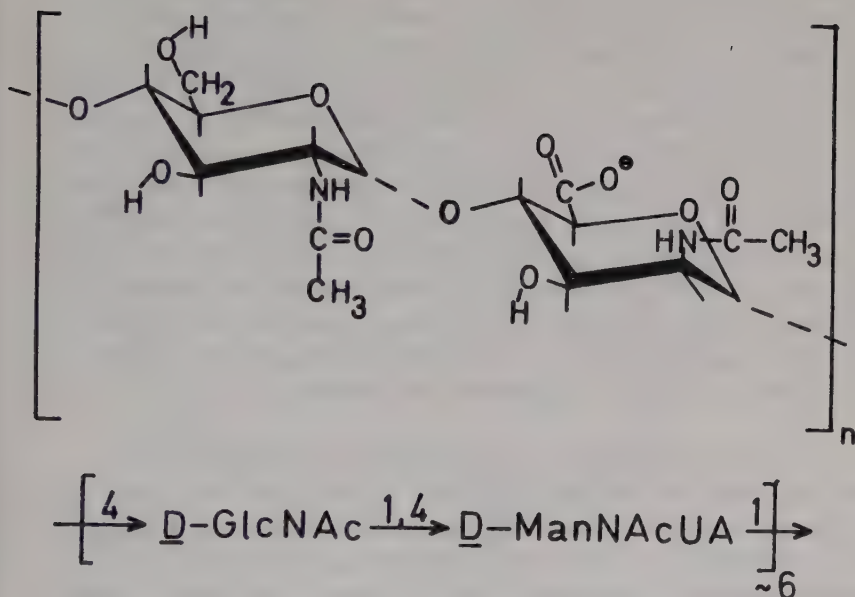


Abb. 6: Strukturvorschlag für den Aminosuckeranteil des ECA (76).

Nach Alkali-Behandlung wird jedoch die Präzipitationslinie einheitlich und deutlicher abgegrenzt (77). Die Veresterung der Carboxyl-Gruppe der Mannosaminuronsäure im Polymeren führt zum Verlust der Präzipitationsfähigkeit, die jedoch durch Verseifung wiedergewonnen werden kann. Das beweist, daß D-Mannosaminuronsäure eine wichtige Komponente der serologischen Determinanten des ECA darstellt. D-Mannosaminuronsäure ist ein seltener Zucker, der bei gram-negativen Bakterien

außer in ECA sonst nur in den serologisch verwandten K7- und K56-Antigenen von E.coli (21,81) gefunden werden konnte. Neben ECA-spezifischen serologischen Nachweisen kann dieser seltene Zucker als ECA-Indikator benutzt werden, da er leicht (als Mannosaminuronsäure-Lacton) durch Papierelektrophorese nachgewiesen werden kann (76). Isoliertes ECA besitzt durch seinen amphiphilen Charakter eine hohe Oberflächenaktivität, weshalb es ohne Vorbehandlung leicht auf Erythrozyten, Lymphozyten und Fibroblasten aufziehen kann. Auch von Essigsäure-degradierten Bakterien von Salmonella minnesota R 595 wird es leicht gebunden. Werden Mäuse oder Kaninchen mit solchen ECA-beladenen, Essigsäure-degradierten Bakterien immunisiert, so werden ECA-spezifische Titer erhalten (77). Immunisierungen mit isoliertem ECA hingegen führen bei Kaninchen und Mäusen nur zu geringen und kurzzeitig anhaltenden ECA-Titern (77).

Vom immunologischen Verhalten her werden zwei ECA-Formen unterschieden: Die sogen. immunogene ECA -Form kommt nur bei R-Mutanten vor, die einen kompletten R-Core vom R1- oder R4-Typ aufweisen (s. Abb. 4). Immunisierung mit solchen Hitze-abgetöteten R-Mutanten führt in Versuchstieren zu hohen ECA-spezifischen Titern. Dagegen werden durch Immunisierung mit sogen. nicht-immunogenen Stämmen, die haptenisches ECA enthalten, sehr geringe Titer in Kaninchen erzeugt.

4. Genetische Determinierung von ECA

Die genetische Determinierung von ECA steht in engem Zusammenhang mit der Determinierung der Lipopolysaccharide. Die für ECA wichtigen Genorte sind auf dem in vereinfachter Form gezeigten Chromosom von E.coli in Abb. 7 zu sehen.

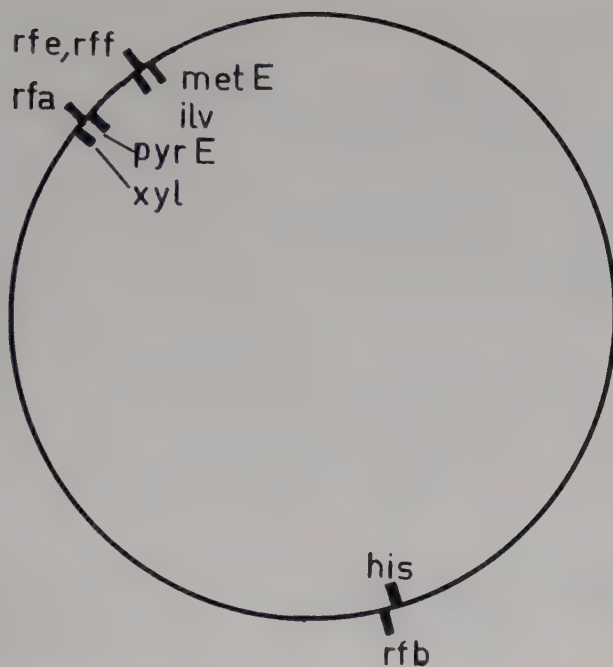


Abb. 7: Schematisches Chromosom mit den Genorten für die Synthese von LPS und ECA (71).

Die rfb-Genorte sind für die Synthese der "repeating units", der O-spezifischen Ketten, von Bedeutung. Vom rfa-Gencluster werden die Enzyme für die Synthese und den Transfer der Core-Zucker codiert (131). Der rfaL-Genort, der ein Teil des rfa-Gencluster ist, codiert einen Teil des Translocase-Systems, das die O-Ketten und vermutlich auch ECA auf den kompletten R-Core überträgt.

Bakterienstämme mit intakten rf-Genorten synthetisieren vollständiges LPS und wachsen in glatten Kolonien, weshalb sie als S (smooth-)-Formen und ihr LPS als S-LPS bezeichnet werden. Defekte im rfb-, rfa- oder im rfe-Gencluster bedingen, daß diese Bakterienstämme in rauen Kolonien wachsen. Sie werden dann als R (rough-)-Mutanten und ihr LPS als R-LPS bezeichnet. Zwischenformen, sogen. S/R- (semi-rauh)-Formen werden bei Salmonella typhimurium durch Mutationen im rfc-Genort verursacht, der für die O-Ketten-Polymerisation verantwortlich ist.

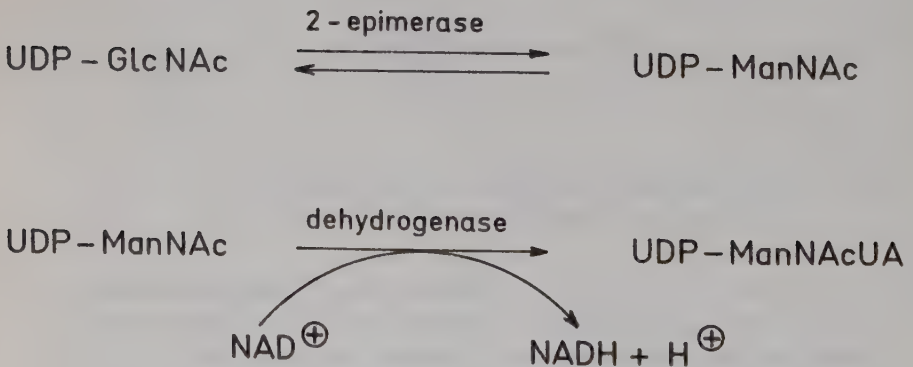


Abb. 8: Biosynthese der N-Acetyl-mannosaminuronsäure

Für die Biosynthese von ECA sind zwei Genorte rfe und rff bekannt (69,70,72,121). Sie liegen in unmittelbarer Nähe des ilv-Genortes auf der Chromosomenkarte (114) und sind mit ilv co-transduzierbar (121). Das rfe-Genprodukt ist bisher unbekannt. Da es in der O-Ketten- und ECA-Biosynthese eine bedeutende Rolle spielt, ist diskutiert worden, daß rfe entweder die Biosynthese des ACL (antigen carrier lipid = Baktoprenol) oder dessen Modifikation bewirkt (69). rff-Gene sind in allerjüngster Zeit als Strukturgene für die Biosynthese der Mannosaminuronsäure erkannt worden (63). Die Biosynthese der UDP-ManNAcUA geht von UDP-GlcNAc aus (s. Abb. 8). Zuerst wird UDP-GlcNAc zu UDP-ManNAc epimerisiert, die dann durch eine NAD^+ -abhängige Dehydrogenase zu UDP-ManNAcUA oxydiert wird. Dieser Biosyntheseweg ist für E.coli (43,54) und für Salmonella typhimurium (63) bewiesen worden.

Die Auswirkungen der rf.-Mutationen auf die Synthese und die Immunogenität von ECA in E.coli und Shigella sind in Tabelle 3 aufgeführt.

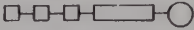
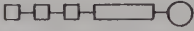
Mutation in	Mutation Effekt	LPS -Struktur	ECA Präsenz in Bakterien	ECA Immunoge- nität
—	—	O-Kette Core LipidA 	+	—
rff	ECA Synthese		—	—
rfb	O-Ketten Synthese	ECA 	+	+
rfe	?????		—	—
rfaL	ECA und O-Ketten Translokation		+	—
rfa	Core Synthese		+	—

Tabelle 3: ECA-Synthese und ECA-Immunogenität in Bakterienstämmen mit R1- oder R4-Coretypen in Abhängigkeit von rf.-Mutationen.

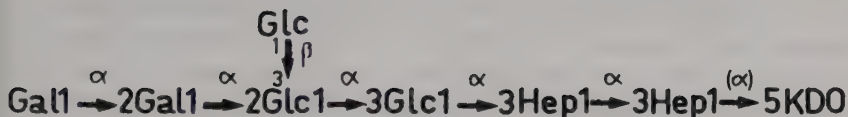
Nur wenn eine Mutation im rff-Genort vorliegt und alle anderen, die LPS- und ECA-Biosynthese betreffenden Genorte, intakt sind, ist ECA immunogen. Das gilt jedoch nur dann, wenn die R-Mutanten den R1- oder R4-Coretyp ausbilden (83,94,119). Die Frage, weshalb die Immunogenität des ECA von der LPS-Struktur abhängt, wurde in der Weise beantwortet, daß ECA mittels der Translocase (rfaL-Genprodukt) auf R-LPS übertragen werden kann. R1-Core-Mutanten mit defektem rfaL-Genort tragen kein immunogenes ECA.

Wenn diese Interpretation richtig ist, dann sollten LPS und ECA bei ECA-immunogenen Stämmen nicht trennbar sein (s.unten).

5. Die molekulare Basis der ECA-Immunogenität

Suzuki et al. (133) stellten bei dem ECA-immunogenen Stamm E.coli O14:K7 fest, daß durch Fraktionierung des Hitzeüberstandes mit 85% wässrigem Äthanol ECA und LPS nicht getrennt werden können. Bei nicht-immunogenen Stämmen war jedoch eine Trennung in Äthanol-lösliches ECA und Äthanol-unlösliches LPS möglich.

coli R1



coli R4

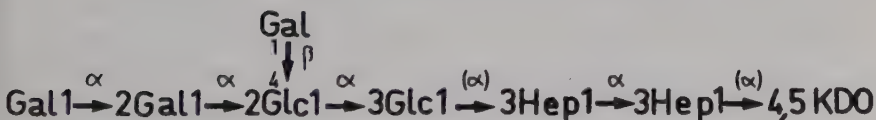


Abb. 9: Chemische Strukturen der R1 und R4-Core-Typen von Lipopolysacchariden (18).

Die chemischen Strukturen der ECA-immunogenen R1 und R4 Core-Typen sind bekannt (18,20,99). Beide R Core-Typen besitzen im Hexoseteil eine identische Tetrasaccharid-Kette aus Galaktosen und Glucosen. Beim R1-Core ist zusätzlich eine D-Glucose als Seitenkette β -1,3 an die zweite Glucose gebunden, während beim R4-Core an derselben Stelle eine β -1,4 -gebundene D-Galaktose sitzt (s. Abb. 9). Aus dieser Strukturähnlichkeit werden serologische Kreuzreaktionen zwischen R1- und R4-Mutanten verständlich (83,85).

Wie oben erwähnt, kann aus ECA-nicht-immunogenen Stämmen ECA durch Äthanol-Fraktionierung isoliert werden. ECA ist in 85% wässrigem Äthanol löslich (133). Überraschenderweise ist dieses LPS-freie ECA bei i.v. Injektion in Kaninchen ebenfalls immunogen. Bei Injektion eines Gemisches beider Fraktionen, der äthanol-unlöslichen und der äthanol-löslichen, wird jedoch die Immunantwort gegen ECA unterdrückt (134). Whang und Neter nannten dieses Phänomen "antigen-associated immunosuppression" (147), da ein enger Kontakt zwischen Hemmstoff (LPS) und Antigen (ECA) vorliegen muß, um die Immunsuppression zu beobachten. Substanzen wie Lipid A (145,148,149) und Cardiolipin und verschiedene Detergentien sind in der Lage, die ECA-Immunantwort zu unterdrücken. Die meisten bisher bekannten Immunsuppressiva sind membranaktive Komponenten, die mit lipidartigen oder amphipathischen Substanzen - wie ECA - Co-Mizellen bilden können (86), wodurch die Immunogenität verändert wird.

6. Problemstellung und Ziel der Arbeit

ECA ist ein gemeinsames Antigen der Enterobacteriaceen, das in der äußeren Membran lokalisiert zu sein scheint. Das ergibt sich aus der Leichtigkeit mit der ECA durch Erwärmen oder durch Ultraschallbehandlung von Enterobacteriaceen-Kulturen ins Milieu abgegeben wird. Weiterhin werden ECA-Antikörper aus Serum selbst durch kurze Inkubation mit

lebenden enterobakteriellen S-Formen rasch erschöpfend absorbiert. Als direkter Nachweis der Lokalisation von ECA in der äußeren Membran gelten die Studien von Aoki et al. (3), der die indirekte Immunofluoreszenz-Technik zur ECA-Lokalisation benutzte. Da diese Reaktion aber nicht mit ECA-spezifischen Seren durchgeführt wurde, ist die ECA-Spezifität der beobachteten Fluoreszenz nicht schlüssig bewiesen.

a) ECA-Antikörper (IgM, IgG) bei verschiedenen Immunisierungen

Bisherige Beobachtungen (150) haben übereinstimmend gezeigt, daß ECA-Antikörper nach i.v. Immunisierung von Kaninchen besonders der IgM-Klasse angehören. Für die Ferritin-Markierungs-Experimente werden aber die IgG-Antikörper bevorzugt eingesetzt, da sie besser mit Ferritinmolekülen konjugiert werden können und weniger als IgM-Antikörper zur Aggregatbildung neigen. Es sollte daher in Vorversuchen geprüft werden, ob durch Variation der Immunisierungstechniken eine Steigerung des IgG-Anteils an den ECA-Antikörpern zu erhalten ist.

b) Studien zur Lokalisation von ECA in der Bakterienzelle

Durch die seit kurzer Zeit in unserem Institut gelungene Konstruktion von ECA-negativen rfe⁻-Mutanten von sonst ECA-immunogenen Stämmen wie z.B. E.coli O14:K7 (R4-Core) oder E.coli O8:K27 (R1-Core) ist die Möglichkeit gegeben, durch Serumabsorption ECA-monospezifische Antiseren zu gewinnen. G. Schmidt hat diese Mutanten durch Einführung des defekten rfe-Genortes von Salmonella montevideo in ECA-immunogene E.coli-Rezipienten erhalten (120).

Mit ECA-spezifischen Seren sollte nach Trennung in die Immunglobulin-Klassen die Verteilung von ECA an der Bakterienoberfläche mit der Ferritin-Technik untersucht werden. Durch Einsatz käuflicher Fluoreszein-isothiocyanat-gekuppelter anti-Kaninchen-Antikörper sollte geprüft werden, ob auch mit der indirekten Immunofluoreszenz-Technik ECA in der Bakterienhülle nachweisbar ist. Dabei sollten in jedem Fall als Kontrollen die weitgehend isogenen ECA-negativen Mutanten eingesetzt werden.

c) Nachweis der kovalenten Bindung von ECA an R-LPS in ECA-immunogenen Stämmen

Von Mayer und Schmidt (83) sowie von Schmidt et al. (121) konnte gezeigt werden, daß in ECA-immunogenen Stämmen Teile von ECA und LPS immer assoziiert vorkommen und daß eine Abtrennung durch Extraktionsverfahren, bzw. physikalische Methoden (Ultrazentrifugation), nicht möglich ist. Suzuki et al. (133) hatten schon früher beobachtet, daß die in 85% wässrigem Äthanol unlösliche LPS-Fraktion bei nicht-immunogenen Stämmen frei von ECA-Spezifität ist im Gegensatz zu entsprechenden Fraktionen ECA-immunogener Stämme.

Daß es sich bei der Bindung von ECA an LPS der R-Formen vermutlich um einen enzymatischen Prozeß handelt, ergibt sich aus der Beobachtung, daß O-translocase-defekte Mutanten (rfaL-Mutanten von ECA-immunogenen Stämmen) keine Assoziation von ECA und R-LPS erkennen lassen und auch nicht ECA-immunogen sind. Das O-Translocase-System ist für die Übertragung der am ACL synthetisierten O-spezifischen Ketten auf den kompletten R-Core verantwortlich. Die Bedeutung des rfaL-Genproduktes für die Immunogenität von ECA ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß ECA, analog zu den O-Ketten, enzymatisch auf den kompletten R-Core übertragen wird. Da ECA-immunogene

Stämme bisher nur mit den chemisch und serologisch eng verwandten R1 und R4 Core-Typen bekannt sind, ist anzunehmen, daß nicht alle R-Core-Strukturen als Akzeptor für ECA geeignet sind. Bisher stand allerdings die chemische Bestätigung dafür noch aus, daß ECA tatsächlich auf R-LPS übertragen wird. Nachdem nun kürzlich die chemische Zusammensetzung von ECA bekannt wurde (76), und nachdem Kiss (57) zeigte, daß ECA durch Wachstum der Bakterien in Gegenwart von ^{14}C -GlcNAc in beiden Aminozykern (GlcNAc und ManNAcUA) markiert werden kann war der Weg vorgegeben, auch kleinste Mengen von LPS-assoziiertem ECA chemisch zu erfassen. Die beiden in ECA-immunogenen Stämmen vorkommenden R-Core-Typen sind beide frei von GlcNAc (s. Abb. 9). Daher sollte die nach Abspaltung von Lipid A im R-Oligosaccharid verbleibende GlcNAc-Radioaktivität im wesentlichen auf das mit dem R-Core assoziierte ECA zurückzuführen sein.

LPS der ECA-immunogenen R-Stämme sollte nach dem PCP-Extraktionsverfahren gewonnen werden, da bei diesem Verfahren haptisches ECA von LPS restlos abtrennbar ist (83). Der Nachweis von radioaktiv markierter Mannosaminuronsäure in der Hochspannungs-Papierelektrophorese (HVE) sollte ein wichtiges Indiz für die ECA-Präsenz sein. D-Mannosaminuronsäure kommt allerdings bei E.coli O14:K7 auch als Bestandteil des K7-Antigens vor (81), während bei E.coli O8:K27-Stämmen ManNUA als Antigenbestandteil unbekannt ist. Daher wurde der Nachweis der kovalenten Bindung von ECA an den R1-Core mit E.coli O8:K27-Mutanten geführt. Drei phänotypisch identische R1-Mutanten, die jedoch verschiedene rf.-Mutationen enthalten, wurden für die Studien eingesetzt:

nämlich F 470 (rfb⁻ und immunogenes ECA)

F 614 (rfaL⁻ mit nicht-immunogenem, haptischem ECA)

F 1283 (rfe⁻ und ECA-negativ) (s. auch Tabelle 8)

d) Immunisierungen mit Essigsäure-degradierten (HAc) Bakterien

Von Galanos ist gezeigt worden, daß Immunisierung von Kaninchen mit HAc-degradierten Bakterien zur Erzeugung von Lipid A-Titern geeignet ist (24). Dabei wird die säurelabile ketosidische Bindung, die R-Oligosaccharid und Lipid A verknüpft, durch 1 % Essigsäure gespalten und die hydrolytisch freigesetzten R- oder O-Ketten werden vor der Immunisierung sorgfältig gewaschen. Wenn ECA in ECA-immunogenen Stämmen an R-LPS gebunden ist, dann sollte die ECA-Immunogenität durch Essigsäurehydrolyse parallel zur R- oder O-Immunogenität abnehmen, während umgekehrt das kryptische Lipid A-Antigen erst durch die Freisetzung der R- bzw. O-Ketten zum Immunogen werden sollte.

C. ERGEBNISSE

1. Immunologische Eigenschaften von ECA

1.1. Einleitung

Zur Lokalisation des ECA mit Ferritin-Antikörper-Konjugaten wurden Seren mit relativ hohem Gehalt an ECA-spezifischen IgG-Antikörpern benötigt. Um diese zu erhalten, wurden Kaninchen mit verschiedenen ECA-immunogenen Stämmen und nach verschiedenen Immunisierungsschemata immunisiert. Im Verlauf der Immunisierungen wurde neben den ECA-Titern parallel auch die Titer gegen LPS und Lipoprotein bestimmt, um die jeweiligen Versuchsbedingungen zum Erreichen der höchsten Hämagglutinationstiter festzustellen. Durch Auftrennung der Immunsere in die IgM- und IgG-Antikörper-Fractionen wurde bestimmt, ob und zu welchem Ausmaß der Gehalt an IgG-Antikörper gegen ECA durch die Versuchsbedingungen zu variieren ist.

1.2. ECA-spezifische Titer nach Immunisierung mit Bakterien-suspensionen

Für die Immunisierungen wurden Weiße Neuseeländer Kaninchen ausgewählt, die mindestens 12 Wochen alt waren. Sie wurden in Abständen von vier Tagen mit steigenden Mengen (0.25, 0.5 und 1 ml) einer Bakterien-suspension (ca. 10^{10} Zellen/ml) intravenös in die Ohrvene immunisiert. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden

die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. In den erhaltenen Seren wurde Komplement durch Erhitzen (30 min, 56°) zerstört. Die Seren wurden anschließend über Sephadex G 200 in drei Fraktionen aufgetrennt (s.S.37). Für die Titerbestimmung in der passiven Hämagglutinations-Reaktion wurden menschliche Erythrozyten der Blutgruppe A mit den jeweiligen Antigenen (ECA, LPS oder Lipoprotein) beladen und mit den Antiserumverdünnungen in Mikrotiterplatten inkubiert. Der reziproke Wert der Antiserumverdünnung, die gerade noch eine vollständige Agglutination gab, wurde als Titer notiert (94). Die Ablesung der Titer erfolgte nach einstündiger Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37°.

Gruppen von je zwei Kaninchen wurden parallel mit Hitze- und Formalin-abgetöteten sowie mit lebenden Bakterien des E.coli Stammes F 470 immunisiert. Die erhaltenen ECA- und Lipoprotein-Titer sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Als ECA-Quelle wurde ein ECA/LPS-Gemisch von E.coli K-12 D21e8 benutzt (LPS/GR-Fraktion). Um sicher zu sein, daß die erhaltenen Titer ECA-spezifisch sind, wurde eine ECA-freie LPS-Fraktion aus dem gleichen Keim eingesetzt (LPS/GS). LPS von Enterobacteriaceen zieht nicht direkt auf Erythrozyten auf, sondern benötigt eine Vorbehandlung (Alkali-Behandlung; Erhitzen auf 100°). Als weiteres Indikator-Antigen wurde Alkali-behandeltes Braun'sches Lipoprotein aus E. coli B (von V. Braun, Tübingen) auf Erythrozyten aufgezogen. Der höchste ECA-Titer (10240) wurde durch Immunisierung mit lebenden Keimen erhalten. Nach Hitze- oder Formalinabtötung der E.coli-Suspension lagen die ECA-Titer der Seren zwischen 1280 und 2560. Der Lipoprotein-Titer lag dagegen in den Seren gegen Hitze-abgetötete Keime deutlich höher als bei den Seren gegen Formalin-abgetötete oder lebende Bakterien.

Antiserum gegen Stamm E.coli F 470	Behandlung der Bakterien vor der Immunisierung	Indikator - Antigene		
		ECA	LPS/GS <u>E.coli</u> K-12D21e8	Lipoprotein alkali-behandelt
AS 470 L	lebende Keime	10240	<10	40
AS 470 H	hitze-abgetötet (100°; 2h)	2560	<10	160
AS 470 F	Formalin-abgetötet	1280	<10	<10

Tabelle 4: Titer in der passiven Hämagglutination gegen ECA und Lipoprotein in Seren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit lebenden (L), Hitze- (H) oder Formalin- (F) abgetöteten Bakterien erhalten wurden.

In einer zweiten Immunisierungs-Serie wurden Kaninchen mit lebenden und Hitze-abgetöteten Bakterien der beiden E.coli-Stämme F 470 (O8⁻:K27⁻) und F 2387 (O14:K7) immunisiert. Die erhaltenen Seren wurden mit den entsprechenden genetisch verwandten ECA-negativen Stämmen F 1283 und F 1327 erschöpfend absorbiert. Dann wurden die absorbierten Seren in die IgM- und IgG-Fractionen aufgetrennt und die jeweiligen ECA-Titer bestimmt.

Auch bei dieser Immunisierung (s. Tabelle 5) wurden mit lebenden Bakterien höhere Titer gegen ECA erzielt als bei Immunisierungen mit Hitze-abgetöteten Keimen.

Indikator-Antigen ECA von <i>E.coli</i> K-12 D21e8	Antiserum :		
	Vollserum	absorb. Serum	rechromat.Fraktion
AS 470L	10 240	10 240	
IgM 470L	5 120	5 120	
IgG 470L	20	20	
AS 470H	1 280	1 280	
IgM 470H	1 280	1 280	
IgG 470H	80	80	
AS 2387L	5 120	5 120	
IgM 2387L	5 120	5 120	5 120
IgG 2387L	80	20	20
AS 2387H	1 280	1 280	
IgM 2387H	1 280	1 280	
IgG 2387H	20	20	
AS 470L : F 470 (<i>E.coli</i> 08 ⁻ :K27 ⁻) lebend			
AS 470H : F 470 (<i>E.coli</i> 08 ⁻ :K27 ⁻) hitzeabgetötet, 100°, 2 h			
AS 2387L : F 2387 (<i>E.coli</i> 014:K7) lebend			
AS 2387H : F 2387 (<i>E.coli</i> 014:K7) hitzeabgetötet, 100°, 2 h			

Tabelle 5: ECA-Titer in der passiven Hämagglutination in Seren und deren Fraktionen jeweils vor und nach Absorption mit den entsprechenden ECA-negativen rfe-Mutanten.

Durch Absorption der Seren mit den ECA-negativen Stämmen wurden die Titer nicht erniedrigt mit Ausnahme der Antiserum-Fraktion IgG 2387 L, in der der Titer von 80 auf 20, d.h. um zwei Titerstufen, absank. Besonders auffallend sind die hohen ECA-Titer der IgM-Fraktionen, die im allgemeinen nur eine Titerstufe unter den Titern der Vollseren liegen. Die IgG-Titer erreichen nur einen Wert von maximal 80. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß mit der passiven Hämagglutinationsreaktion überwiegend nur IgM-Antikörper erfaßt werden (42).

In einer weiteren Versuchs-Serie wurden Kaninchen mit lebenden und Hitze-abgetöteten Suspensionen der Stämme F 470 und F 1283 (R1-Mutanten), bzw. F 2387 und F 1327 (R4-Mutanten) in den Vollseren, den absorbierten Seren und in den entsprechenden Immunglobulin-Fraktionen bestimmt. Als Indikator-Antigene wurden die Alkali-behandelten R-Lipopolysaccharide der E.coli R1-Mutanten F 470, F 614, F 1283, der E.coli R4-Mutanten F 2387 und F 1327, sowie isoliertes haptenisches ECA von Salmonella montevideo SH 94 eingesetzt (s. Tabelle 6). Auch hier ergab sich, daß bei Immunisierung mit lebenden Bakterien höhere ECA-Titer erhalten wurden, als bei Immunisierung mit Hitze-abgetöteten Bakterien und daß IgM-Antikörper den Hauptanteil der ECA-Titer ausmachen.

Der mit LPS/GS von F 470 als Indikator-Antigen bestimmte Titer in Seren gegen den lebenden bzw. Hitze-abgetöteten Stamm F 470 setzt sich aus zwei Teiltitern zusammen, wie sich aus Absorptionsexperimenten eindeutig ergibt. Es zeigt sich weiterhin,, daß auch LPS/GS des Stammes F 470 beide Spezifitäten (R1- und ECA-Spezifität) besitzt. Das gleiche gilt für LPS/GS des Stammes F 2387. Dagegen ist mit LPS/GS der rfaL⁻-Mutanten F 614, bzw. der beiden ECA-negativen, rfe⁻-Mutanten F 1283 und F 1327 nur die R-Spezifität gekoppelt. Das ist eine Bestätigung der in Kapitel C.3. zu besprechenden Ergebnisse, wonach ECA bei ECA-immunogenen Stämmen, aber nur bei diesen, kovalent am R-Core gebunden ist.

Auffallend ist, daß in dem gegen den lebenden Stamm F 2387 erhaltenen Antiserum ein relativ hoher ECA-Titer in der IgG-Fraktion enthalten ist. Entsprechend gaben auch die gegen diesen Stamm (F 2387) gewonnenen Seren in der Gelpräzipitation die besten Ergebnisse.

Antiserum gegen Stamm	Indikator-Antigene LPS/GS von:				ECA (SH 94)
	F 470	F 614	F 1283		
F 470 L (=lebend)	5120 ****	1280	640		> 10240
F 470L; % absorbiert *	640	10	10		2560
F 470L; % IgM-Frakt. *	1280	--	--		> 10240
F 470L; % IgG-Frakt. *	<10				40
F 470L; % Albumin-Frakt. *	<10	--	--		<10
F 470 H (=hitzeabgetötet)	1280 ****	320	640		5120
F 1283 L	640	640	1280 ****		20
F 1283 H	320	320	640 ***		<10

Antiserum gegen Stamm	Indikator-Antigene LPS/GS von:				ECA (SH 94)
	F 2387	F 470	F 1283	F 614	
F 2387 L	5120	2560	80	40	2560
F 2387 L % **	5120	2560	40	40	2560
F 2387 L % IgM-Frakt. **	5120	1280	--	--	> 10240
F 2387 L % IgG-Frakt. **	20	10	--	--	320
F 2387 L % Albumin-Frakt. **	<10	<10	--	--	<10
F 2387 H	1280	640	40	40	1280
F 1327 L	320	160	320	160	20
F 1327 H	80	40	80	40	<10

Tabelle 6: Titer in der passiven Hämagglutination in Seren und deren IgM- bzw. IgG-Fraktionen gegen LPS/GS, R-LPS und ECA nach Immunisierung mit verschiedenen Bakterien.

* = mit rfe^- -Mutanten F 1283

** = mit rfe^- -Mutanten F 1327

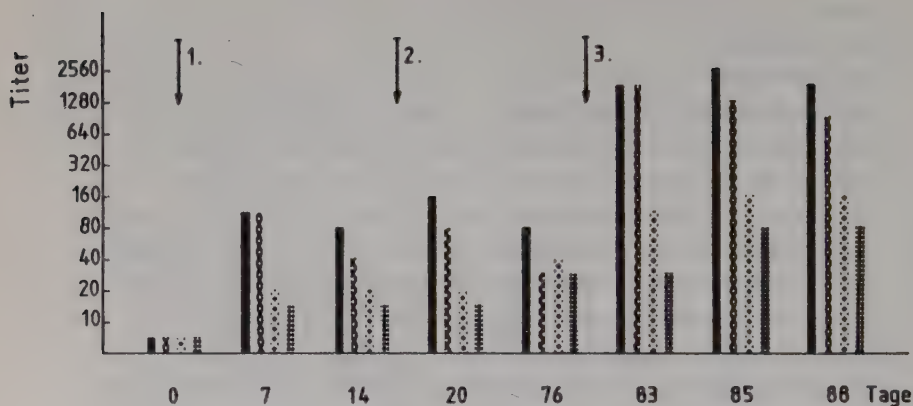
% = steht für erfolgte Serumabsorption

1.3. Weitere Untersuchungen zur Antikörperantwort gegen ECA im Kaninchen

Nachdem gezeigt wurde, daß bei Immunisierungen im 4-Tage-Abstand nur geringe ECA-Titer in den IgG-Fractionen enthalten sind, wurde versucht, durch eine andere Immunisierungstechnik den IgG-Anteil der ECA-spezifischen Antikörper zu erhöhen. Weiße Neuseeländer Kaninchen wurden an Tagen 0, 15 und 78 mit jeweils 1 ml (ca. 10^{10} Zellen/ml) einer Suspension von lebenden E.coli F 470 i.v. immunisiert. Vor der ersten Injektion und an den Tagen 7, 14, 20, 76, 83, 85 und 88 wurde zur Titerbestimmung Venenblut entnommen und in den Seren nach Komplementzerstörung die ECA-, R1- und Lipoprotein-Titer bestimmt. Ein Teil der Seren wurde über Sephadex G 200 in die IgM- und IgG-Fractionen aufgetrennt und deren jeweilige Titer festgestellt. Zusätzlich wurde das Vollserum mit Dithiothreitol (DTT) versetzt, um die IgM-Antikörper zu inaktivieren und damit die Anteile der IgM- bzw. IgG-Antikörper am Gesamt-ECA-Titer zu bestimmen (98). Die ECA-Titer sind in Abb. 10, die R1-Titer in Abb. 11 und die Lipoprotein-Titer in Abb. 12 graphisch dargestellt.

Es wurde erhofft, daß durch Immunisierung der Kaninchen über einen längeren Zeitraum hinweg ein Anstieg des IgG-Antikörper-Anteils der ECA-spezifischen Antikörper zu erreichen ist. Wie jedoch aus Abb. 10 hervorgeht, besteht auch bei diesem Immunisierungsschema die Antikörperantwort gegen ECA hauptsächlich in der Bildung von IgM-Antikörpern. Die IgM-Titer liegen maximal nur eine Titerstufe unter den Titern der Vollseren.

Durch die DTT-Behandlung konnte offensichtlich nicht immer eine vollständige IgM-Inaktivierung erzielt werden, so daß die Titer der DTT-behandelten Seren und die IgG-Titer bis



Titer in der passiven Hämagglutination

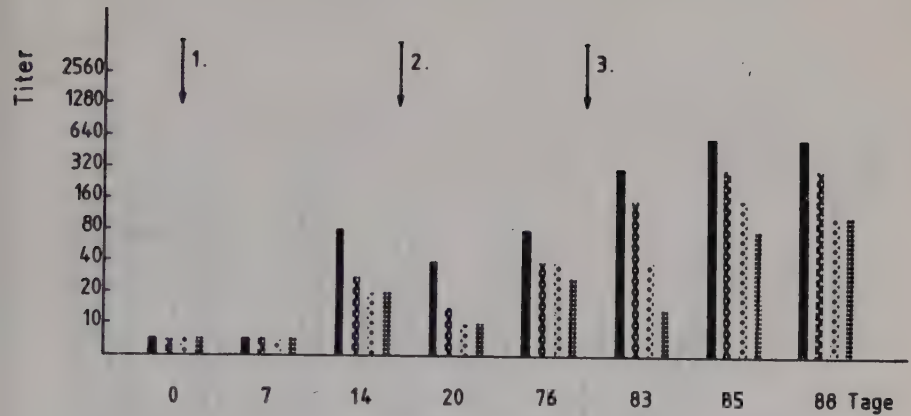
Es wurden an den Tagen 0, 15 und 78 jeweils 10^{10} Zellen von E.coli F470 (100°C) i.v. injiziert.

Indikatorantigen: ECA von E.coli K12D21 e8

- = Vollserum (VS)
- ▨ = IgM-Fraktion
- ◐ = VS + DTT (Dithiothreitol)
- ▤ = IgG-Fraktion

Abb. 10: ECA-Titer in der passiven Hämagglutination

zu zwei Titerstufen differieren. Der IgG-Titer steigt auch nach längerer Immunisierung nur bis auf einen Wert von ca. 80 an. Auch wenn man berücksichtigt, daß in der passiven Hämagglutination überwiegend IgM-Antikörper erfaßt werden (42), so fällt im Vergleich doch auf, daß bei gleichen oder sogar niedrigeren Gesamt-Titern die IgG-Titer gegen Lipoprotein (Titer 640) etwa achtmal so hoch liegen wie diejenigen gegen ECA. Gegen die R-Core-Strukturen werden ebenfalls überwiegend IgM-Antikörper und nur zu geringerem Ausmaß IgG-Antikörper



Titer in der passiven Hämagglutination

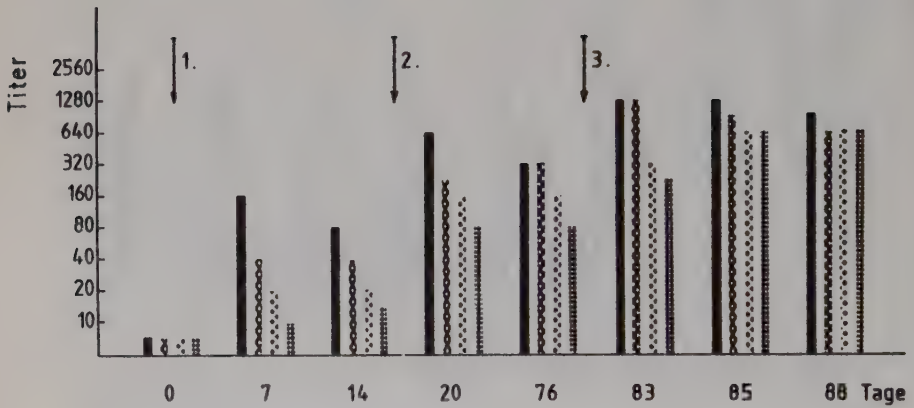
Es wurden an den Tagen 0, 15 und 78 jeweils 10^{10} Zellen von E.coli F470 (100°C) i.v. injiziert.

Indikatorantigen: LPS/GS von E.coli 06-K27⁻ (F1203)

- = Vollserum (VS)
- ◐ = IgM - Fraktion
- ◑ = VS + DTT (Dithiothreitol)
- ▨ = IgG - Fraktion

Abb. 11: R1-Titer in der passiven Hämagglutination

nach langer Immunisierungsdauer gebildet werden. Die IgG-Antikörperquote gegen das (Murein-gebundene) Lipoprotein ist dagegen wesentlich höher und erreicht sogar beinahe den IgM-Wert. Nach der zweiten Injektion ist der Booster-Effekt bei den Lipoprotein-Antikörpern deutlicher ausgeprägt, als bei LPS- und ECA-Antikörpern.



Titer in der passiven Hämagglutination

Es wurden an den Tagen 0, 15 und 78 jeweils 10^{10} Zellen von E.coli F470 (100°C) i.v. injiziert.

■ = Vollserum (VS)

Indikatorantigen: Braun'sches Lipoprotein

◻ = IgM-Fraktion

◌ = VS + DTT (Dithiothreitol)

▨ = IgG-Fraktion

Abb. 12: Titer gegen (Murein-gebundenes) Lipoprotein in der passiven Hämagglutination

1.4. Auftrennung von monospezifischen ECA-Antiseren in die IgM- und IgG-Fractionen

Nach Immunisierung der Kaninchen mit lebenden Bakterien von E.coli F 470 und F 2387 wurden die höchsten Titer gegen ECA erhalten (s. Tabelle 5). Aus diesen Antiseren (AS 470L und AS 2387L) wurden ECA-monospezifische IgG-Antikörper für die folgenden Lokalisationsstudien mit Ferritin- und Fluoreszein-markierten anti-Antikörpern isoliert. Dazu wurden die Seren mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünnt und das Antiserum AS 470L mit lebenden Bakterien von E.coli F 1283 (ECA-negativ) und das Antiserum AS 2387L mit Keimen von E.coli F 1327 drei Stunden bei 37° zusammen inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden bei 4° wurden die Bakterien aus den Seren abzentrifugiert und ihre ECA-, R- und Lipoprotein-Titer in der passiven Hämagglutination ermittelt. Die Titer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Es ist ersichtlich, daß die ECA-Titer durch die Absorption nicht erniedrigt sind, während R- und Lipoprotein-Titer aus den Seren eliminiert wurden.

Die beiden Seren wurden dann über Sephadex G 200 in die Immunglobulin-Fractionen IgM und IgG aufgetrennt. Die Auftrennung des Serums AS 470L % (% = dieses Zeichen steht für erfolgte Serumabsorption) ist in Abb. 13 wiedergegeben. Jeweils 2 bis maximal 6 ml Serum wurden auf eine Chromatographie-Säule (100 x 2.7 cm Ø) aufgetragen und mit Porath-Puffer eluiert (105). Die IgM- und IgG-Fractionen wurden gesammelt und 72 - 100 Stunden gegen PBS mit mehrmaligem Wechsel des Außenmediums dialysiert. Nach der Dialyse wurden die Fractionen auf das Volumen des aufgetragenen Serums eingeengt und zur Rechromatographie erneut auf die Säule aufgetragen, um eine möglichst vollständige Trennung der IgM- und IgG-Antikörper zu erhalten. Das Elutionsdiagramm der IgM-Fraction ist in Abb. 14 und das der IgG-Fraction in Abb. 15 wiedergegeben.

Antiseren gegen lebende					
Bakterien der beiden		ECA	LPS/GS	LPS/GS	Lipo -
Stämme F 470 und F 2387		M12D21e8	F 1283	F 1327	protein
F 470 L	Vollserum	10240	640	--	80
	IgM-Fraktion	5120	1280	--	80
	IgG-Fraktion	20	40	--	10
	absorb. Vollserum	10240	<10	--	<10
	absorb. IgM-Fraktion	5120	<10	--	<10
	absorb. IgG-Fraktion	20	<10	--	<10
	rechromat. IgM-Fraktion	5120	--	--	--
	rechromat. IgG-Fraktion	20	--	--	--
	Vollserum	5120	--	2560	160
	IgM-Fraktion	5120	--	1280	80
F 2387 L	IgG-Fraktion	80	--	80	20
	absorb. Vollserum	5120	--	<10	<10
	absorb. IgM-Fraktion	5120	--	<10	<10
	absorb. IgG-Fraktion	20	--	<10	<10
	rechromat. IgM-Fraktion	5120	--	--	--
	rechromat. IgG-Fraktion	20	--	--	--

Tabelle 7: Titer in der passiven Hämagglutination gegen ECA, R-Antigene und Lipoprotein in Seren vor und nach Absorption und nach Fraktionierung der Seren.

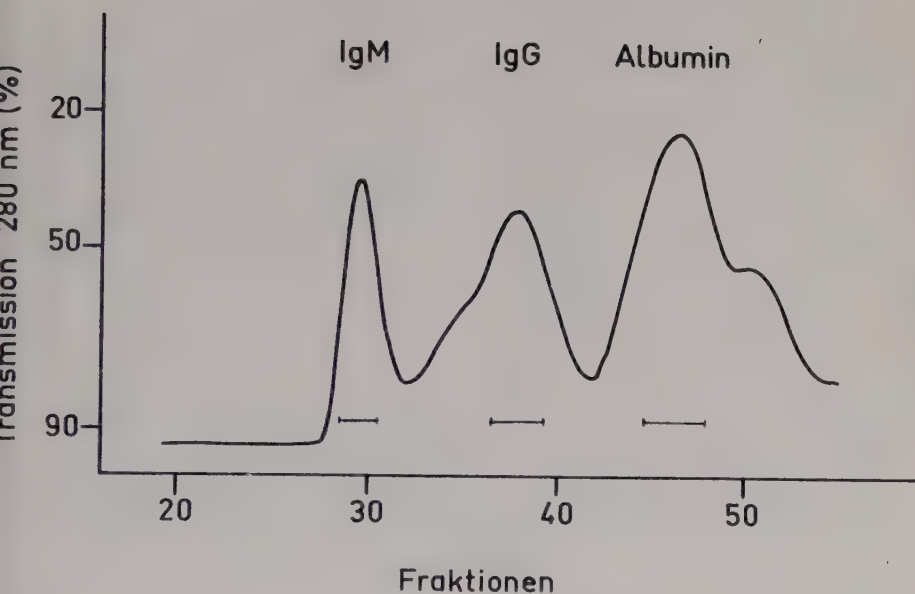


Abb. 13: Serumauftrennung über Sephadex G 200

Auch die getrennten Immunglobulin-Fraktionen IgM und IgG erlitten durch die Serumabsorption keinen ECA-Titerverlust, im Gegensatz zu R- und Lipoprotein-Titern (s. Tabelle 7).

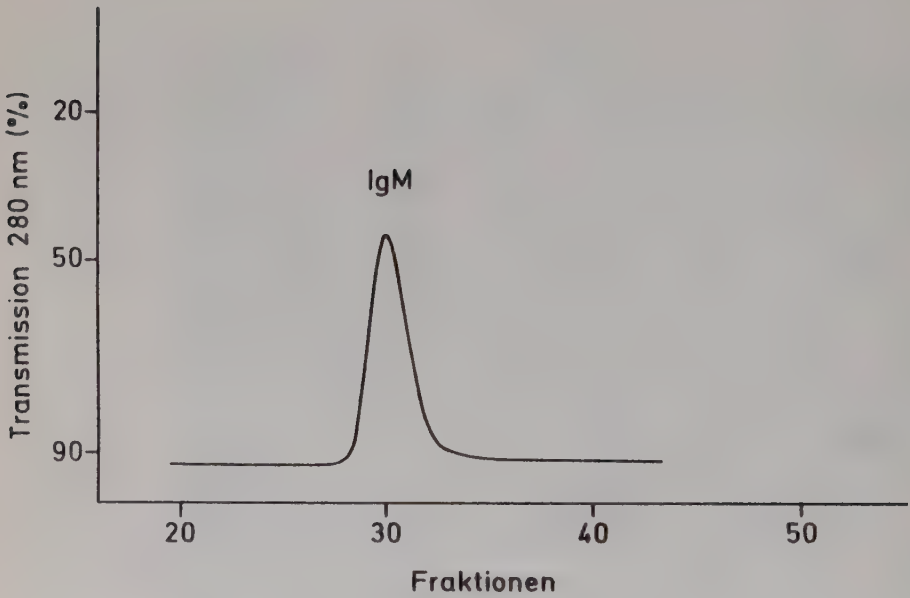


Abb. 14: Rechromatographie der IgM-Fraktion aus Abb. 13

Um die Vollständigkeit der Trennung zu überprüfen, wurden die isolierten Einzelfraktionen mit Antiseren von Schaf, Ziege und Schwein gegen Kaninchen-Immunglobuline, Kaninchen-IgM und Kaninchen-IgG in der Immunelektrophorese getestet.

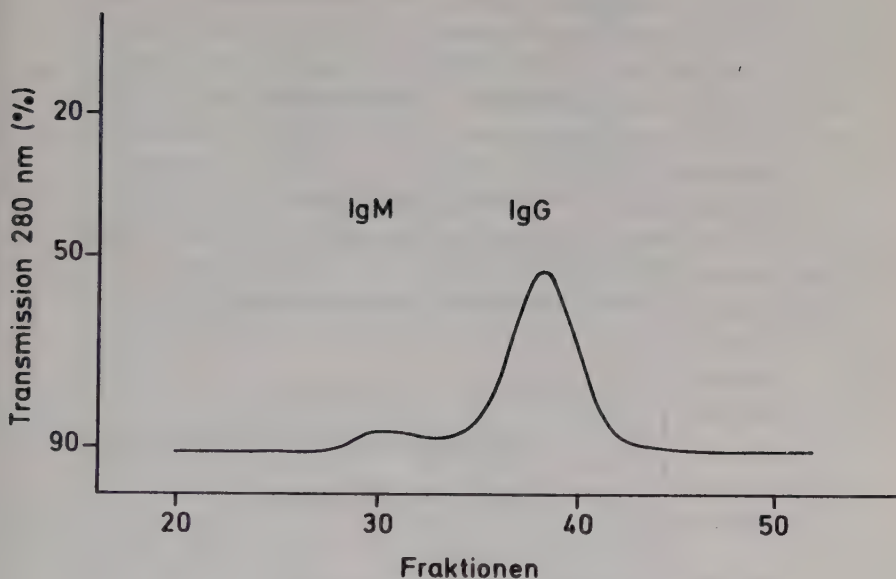


Abb. 15: Rechromatographie der IgG-Fraktion aus Abb. 13

Die Ergebnisse mit einem Serum (AS 470L) und dessen Einzel-fraktionen sind in Abb. 16 dargestellt. Nach der Absorption und der Auftrennung zeigen die Fraktionen IgM 470L % (Abb. 16d, 16e) und IgG 470L % (Abb. 16g, 16i) kürzer und schwächer ausgebildete Präzipitationslinien als die ent-sprechenden Fraktionen des nicht absorbierten Serums, was einen Konzentrationsverlust an IgM- und IgG-Antikörpern anzeigt. Die fehlenden Präzipitationslinien in Abb. 16f, 16h zeigen die vollständige Trennung von IgM- und IgG-Antikörper an, was für die folgenden Untersuchungen eine wichtige Voraus-setzung war.

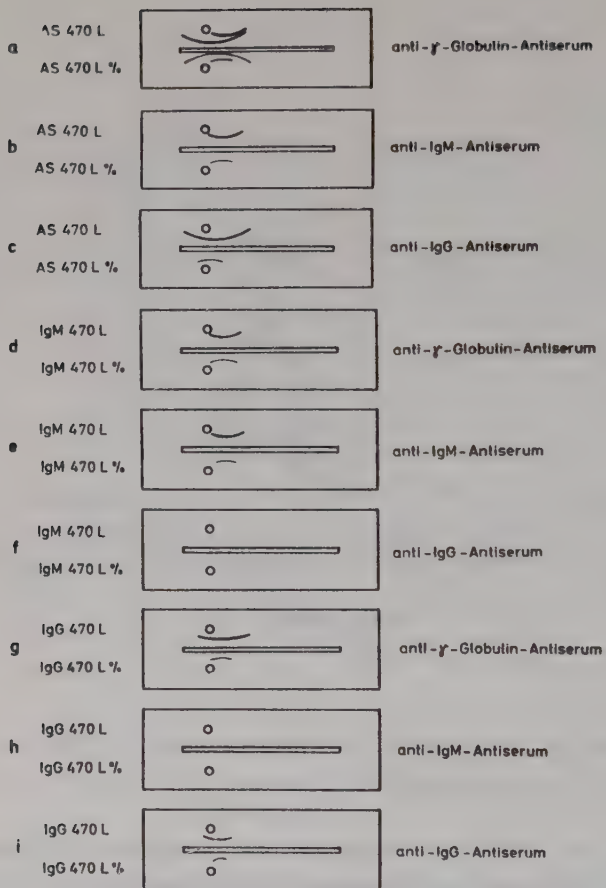


Abb. 16: Präzipitationsmuster der Fraktionen eines aufgetrennten Kaninchenserums mit Antiseren gegen Kaninchen-Immunglobuline.

1.5. Zusammenfassung

Immunisierungen von Kaninchen mit lebenden Bakterien ergeben die höchsten ECA-Titer. Nach Absorption mit ECA-negativen Bakterien wird keine Abnahme der ECA-Titer in der passiven Hämagglutination festgestellt. Die IgM-Titer erreichen fast die Höhe der Vollseren-Titer, während die IgG-Titer niedrig bleiben. Auch nach lang andauernder Immunisierung bleiben die IgG-Titer auf niedrigem Stand. Bei Lipoprotein steigt dagegen der IgG-Anteil im Laufe der Zeit stark an. Gegen ECA werden im Kaninchen bei verschiedenen Immunisierungen überwiegend nur IgM-Antikörper gebildet.

2. Lokalisation des immunogenen ECA

2.1. Einleitung

Die über Sephadex G 200 isolierten IgG-Antikörper wurden mit Ferritin gekuppelt und anschließend zusammen mit einer Auswahl genetisch eng verwandter Bakterien inkubiert (90). Nach Anwendung des Gefrierätzverfahrens (87) wurden die freigelegten Oberflächen der Bakterien im Elektronenmikroskop daraufhin untersucht, ob und in welchem Ausmaß Ferritin-markierte Antikörper angelagert wurden. Ähnliche Markierungsversuche wurden mit Fluoreszein-markierten anti-Antikörpern unternommen.

In Ergänzung dazu wurden Sphäroplasten und Protoplasten L-Formen von Proteus mirabilis ebenfalls mit Ferritin- und Fluoreszein-markierten Antikörpern beladen und mittels Gefrierätzung und Ultradünnschnitt-Technik untersucht. Von diesen Markierungsversuchen wurden Aussagen über die Lokalisation von ECA in der Zellwand und über dessen Verteilung auf der Bakterienoberfläche erwartet.

2.2. Kupplung von IgG an Ferritin über Glutardialdehyd

Die isolierten ECA-spezifischen IgG-Antikörper wurden über Glutardialdehyd mit Ferritin konjugiert (90,139). In einem Vorversuch wurden die optimalen Konzentrationen der Reaktionspartner bestimmt, die dann im Hauptversuch in Boratpuffer pH 7.5 bei 0° eingesetzt wurden. Über eine Sepharose 4B-Säule wurde das Konjugat-Gemisch aufgetrennt. Abbildung 17 zeigt das Elutionsdiagramm (an Sepharose 4B) eines Konjugat-Gemisches zwischen Ferritin und IgG von einem Antiserum AS 470L %. Als Elutionsmittel für die Trennung bei 4° diente VBS-Puffer pH 7.5 (49).

Das Proteineluat wurde in drei Fraktionen aufgeteilt. Im Ausschlußvolumen der Fraktionen 29 - 37 erschienen große Aggregate von Ferritin-Antikörper-Konjugaten. Die Fraktionen 38 - 67 enthielten Ferritin-Antikörper-Komplexe von mittlerer Größe. In den Fraktionen 68 - 80 lagen hauptsächlich ungekoppelte Ferritin- und Antikörpermoleküle vor. Entsprechend der Fraktionsbereiche wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt und eingeengt. Alle drei Hauptfraktionen zeigten in der passiven Hämagglutination Reaktivität gegen ECA. Für die Beladung der Bakterien wurde aber nur die mittlere Hauptfraktion (Fraktionen 38 - 67) eingesetzt. Bei den großen Aggregaten im

Ausschlußvolumen besteht die Gefahr, daß bei Waschvorgängen die angelagerten Ferritin-Konjugate durch auftretende Scherkräfte losgerissen werden können (25). Weiterhin können große Aggregate wegen ihrer Größe falsche Lokalisations- und Verteilungsergebnisse vortäuschen.

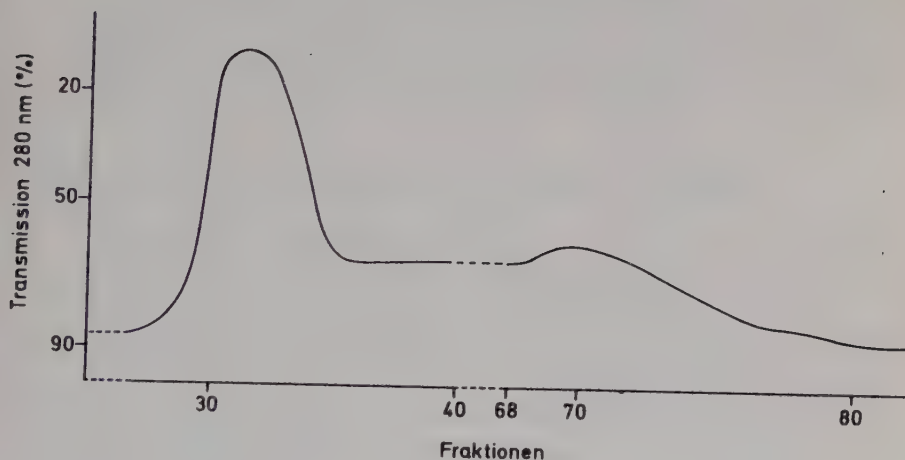


Abb. 17: Trennung von Ferritin/Antikörper-Konjugat-Gemisch über Sepharose 4B.

2.3. Auswahl der Bakterienstämme zur Beladung mit markierten Antikörpern

Für die Markierungsversuche wurden genetisch verwandte Bakterien der Gattungen E.coli und Proteus mirabilis ausgewählt (s. Tabelle 8).

Stamnummer	Spezies/Serotyp	LPS-Typ	ECA-Form	LPS und ECA relevante Gendefekte
F 470	<u>E.coli</u> 08 ⁻ :K27 ⁻ :H ⁻	R1-Core	imm.	rfb ⁻
F 614	<u>E.coli</u> 08 ⁻ :K27 ⁻ :H ⁻	R1-Core	+	rfaL ⁻
F 1283	<u>E.coli</u> 08 ⁻ :K27 ⁻ :H ⁻	R1-Core	-	rfe ⁻ /rff ⁻
F 2387	<u>E.coli</u> 014:K7	R4-Core	imm.	
F 1327	<u>E.coli</u> 014:K7	R4-Core	-	rfe ⁻ /rff ⁻
UL 19	<u>Proteus mirabilis</u> Sphäroplast		(+)	
LD 52	<u>Proteus mirabilis</u> Protoplast		-	

Tabelle 8: Zusammenstellung der Bakterien für die Beladung mit markierten Antikörpern.

imm. = immunogenes ECA

+

= haptenisches ECA

-

= ECA-negativ

Die E.coli Stämme gehören den Serotypen O8⁻:K27⁻:H⁻ und O14:K7 an, wobei die O8-Stämme Lipopolysaccharid mit dem R1-Core-Typ besitzen, während die O14-Stämme den R4-Core aufweisen. Die E.coli-Stämme F 470 und F 614 wurden von E.coli E 56b erhalten (119). Sie enthalten beide ECA, aber nur beim erstgenannten Stamm ist es immunogen. Der ECA-negative Stamm F 1283 ist ein Hybrid von E.coli O8:K27 und Salmonella monteideo (121). Von den E.coli O14-Stämmen besitzt der Stamm F 2387 die immunogene ECA-Form, während der Stamm F 1327 eine ECA-negative Mutante von F 2387 darstellt.

Von Proteus mirabilis-Bakterien wurden Sphäroplasten UL 19 mit ECA-Gehalt (s. 2.7. und 2.8.) und der ECA-freie Proto-plast LD 52 ausgewählt, die uns beide von Prof. Dr. H.Martin, Darmstadt, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden.

2.4. Beladung von Bakterien mit markierten Antikörpern

Die in Tabelle 8 beschriebenen E.coli-Bakterien und Proteus mirabilis L-Formen wurden mit IgG-Ferritin-Konjugaten nach zwei verschiedenen Methoden beladen (s. Abb. 18). Bei der direkten Methode wurde das Sediment einer Bakteriensuspension mit Konjugat 2 h bei 37° inkubiert. Von den markierten Bakterien wurden kleine Präparate von etwa 0.5 mm Durchmesser auf Goldträger oder Trägerplättchen aus dünnem Karton hergestellt, die danach in Freon 22 Schock-eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden. Bei der indirekten Methode wurden Bakterien zuerst mit ungekuppeltem ECA-spezifischem IgG inkubiert. In einem nachfolgenden zweiten Schritt wurden sie dann mit Ferritin-markierten anti-Antikörpern versetzt, die aus Ziegenserien

Ferritin — Markierung

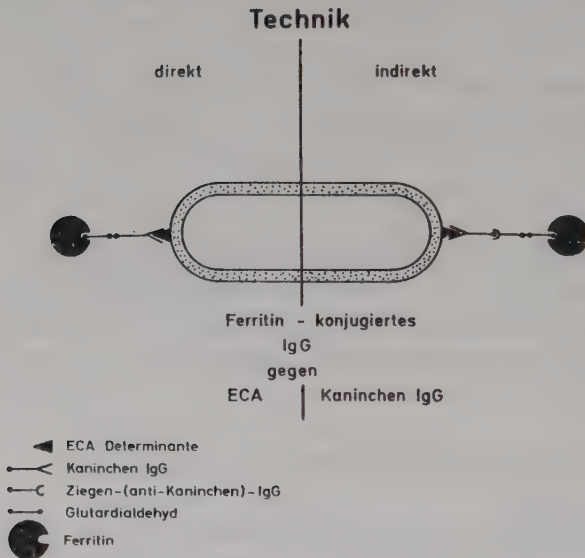


Abb. 18: Schematische Darstellung der Beladung von Bakterien mit markierten Antikörpern nach der direkten und indirekten Technik.

nach Immunisierung mit Kaninchen-IgG isoliert worden waren. Auch diese beladenen Bakteriensedimente wurden in kleinen Portionen in Freon 22 eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Als Kontrollen für die direkte Ferritin-Markierung wurden unmarkierte Bakteriensedimente eingefroren. Bei der indirekten Methode wurden für die Kontrollen im ersten Inkubationsschritt IgG-Antikörper aus Normal-Kaninchenserum, d.h. aus Seren nicht-immunisierter Kaninchen, eingesetzt.

Die Weiterverarbeitung der Sedimente in der Gefrierätzung übernahm Dr. J.R. Golecki (Universität Freiburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie), der auch die Herstellung der Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen durchführte.

Die Beladung der Bakterien mit Fluoreszein-markierten Antikörpern wurde nur nach der indirekten Technik durchgeführt. Im ersten Inkubationsschritt wurde das Bakterien-sediment in einer IgG-Lösung aufgenommen und nach 2 Stunden bei 37° wieder abzentrifugiert. Nach Waschen mit PBS folgte die zweite Inkubation mit Fluoreszein, das an anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern von Schaf oder Ziege gekuppelt war. Diese Inkubation wurde bei 37° unter leichtem Schütteln für 2 Stunden durchgeführt. Von den abzentrifugierten Bakterien wurden jeweils 2 µl auf Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und mit Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden die Präparate sofort im Mikroskop untersucht und bei verschiedenen, von der Intensität der Fluoreszenz abhängigen Belichtungszeiten fotografiert.

.5. Elektronen-mikroskopische Untersuchungen von Ferritin-beladenen Bakterien

Die Ferritinpartikel, die einen Durchmesser von etwa 11 nm besitzen, erscheinen auf den Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen als runde Auflagerungen auf den Oberflächen der Bakterienzellwand. Sie erhalten durch die Bedampfung mit Platin/Kohle eine kontrastreiche "Vorderseite" und eine kontrastarme Schattenseite. Häufig sind die Ferritinpartikel zu mehreren zusammengelagert, ohne daß ihre Eigenform völlig verschwindet.

Diese Eigenform ist an den Einbuchtungen der Ferritinaggregate noch zu erkennen. Zusammengelagerte, sowie auch einzelne Partikel sind auf den EM-Aufnahmen durch Pfeile mit Schäften gekennzeichnet.

Legende zu den EM-Abbildungen

Gefrierätzung (1-2 min; -110° , 5×10^{-6} Torr)

Platin/Kohle-Bedampfung

Endvergrößerung: 129 000 : 1 und 58 000 : 1 (Ultradünnschnitte)

Pfeile mit Schäften (➡) kennzeichnen Ferritinpartikel

Pfeile ohne Schäfte (►) weisen auf "blebs" hin

Pfeile in den oberen Ecken (➡) zeigen die Bedampfungsrichtung an

- OM = Oberfläche der äußeren Membrane (outer membrane)
- CM = Oberfläche der cytoplasmatischen Membran (cyto-
plasmic membrane)
- b = Vesikel mit Material der äußeren Membran (blebs)
- PF = Protoplasmatische Bruchhälfte (protoplasmic
fracture face)
- CE = Zellhülle (cell envelope)

Abb. 19 zeigt den Stamm F 470 nach der direkten Markierung. Auf der Oberfläche der äußeren Membran (OM) liegen die Ferritinpartikel überwiegend in Gruppen zusammen, die wiederum ziemlich regelmäßig über die Oberfläche verteilt sind. Zwischen dieser

"cluster"-artigen Verteilung können separat liegende, vereinzelte Ferritinpartikel erkannt werden. Gleichwertige Beladungsverhältnisse wurden auch nach der indirekten Methode erhalten. Die dazu gehörigen Kontrollen (Abb. 20,21) zeigen glatte bzw. Ferritin-freie (Abb. 21) Oberflächen. Die Beladung des Stammes F 614 nach der direkten Methode ist in Abb. 22, die nach der indirekten Technik in Abb. 23 wiedergegeben. Hier ist die Ferritin-Auflagerung auf der äußeren Membran wesentlich geringer. Die Partikel liegen nach beiden Präparationsmethoden weiter auseinander und nur manchmal bilden sich "cluster". Durch ihre Anwesenheit zeigen sie den ECA-Gehalt der äußeren Membran an. Die dazu gehörigen Kontrollen sind in den Abb. 24 und 25 gegeben. Auf den Bakterienoberflächen (Abb. 22-25) treten manchmal sogen. "blebs" auf, die nur bei R-Mutanten festgestellt wurden und die nach Smit (129) Vesikel darstellen, die mit Material der äußeren Membran angefüllt sind. Ihre Entstehungsursache ist noch unbekannt. Diese "blebs" treten auch bei den Kontrollen auf, die ebenfalls glatte, Ferritin-freie äußere Membranen aufweisen. In Abb. 25 sind im rechten Bildbereich 3-5 Ferritinpartikel angelagert, von einer Ferritin-Beladung kann man dabei jedoch kaum sprechen. Die Auflagerung ist wahrscheinlich auf unspezifische Prozesse zurückzuführen, da die gesamte übrige Oberfläche des Bakteriums keine Ferritinpartikel aufweist. Eine unspezifische Ferritinanlagerung läßt auch die Abb. 26 mit der ECA-negativen Mutante F 1283 erkennen. Hier liegen die Ferritinpartikel in Membranfalten, wo sie wahrscheinlich die Waschungen nach der Beladung überstanden haben. Abgesehen von den vereinzelten unspezifischen Anlagerungen erweisen sich die Oberflächen der äußeren Membran des Stammes F 1283 nach beiden Techniken einschließlich der Kontrollen glatt und Ferritin-frei, aber mit "blebs" übersät. Aus diesem Grunde werden hier nur EM-Aufnahmen nach der direkten und indirekten Methode ohne Kontrollen gezeigt (Abb. 26,27).

Die Auflagerung und Verteilung von Ferritinpartikel auf der Oberfläche der äußeren Membran des E.coli O14-Serotyps F 2387 in Abb. 28 entspricht genau den Verhältnissen, wie bei dem O8-Stamm. Das Erkennen der Ferritinpartikel wird hier nur durch weitere Auflagerungen, vermutlich das K7-Antigen, erschwert. Trotzdem können bei E.coli O14-Serotypen, genau wie bei O8-Serotypen, durch Markierungsuntersuchungen mit Ferritin-markierten IgG-Antikörpern ECA-freie R-Mutanten von solchen mit ECA-Gehalt unterschieden werden.

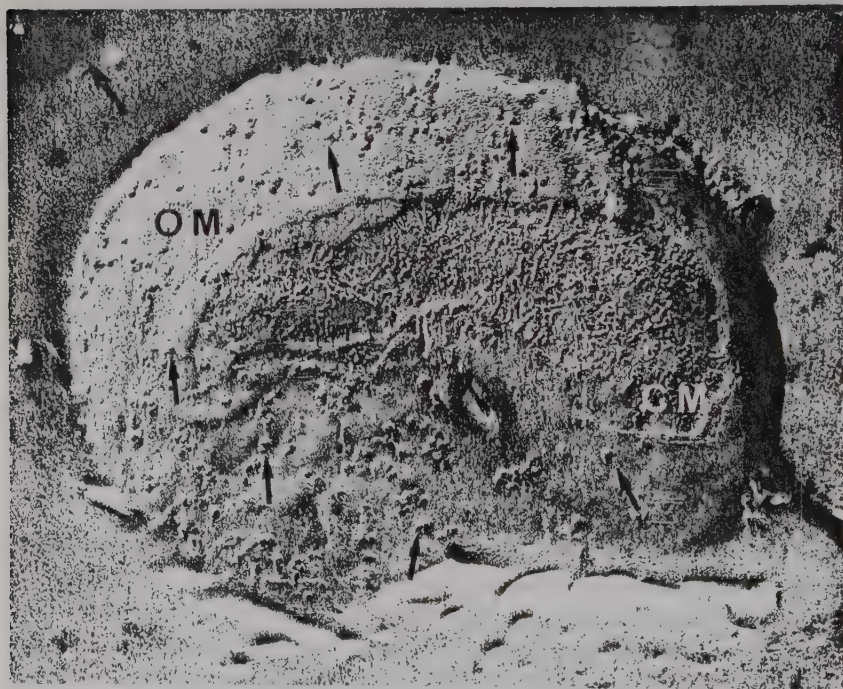


Abb. 19: Zelloberfläche von E.coli F 470 nach Beladung mit ECA-IgG/Ferritin-Konjugaten nach der direkten Methode.

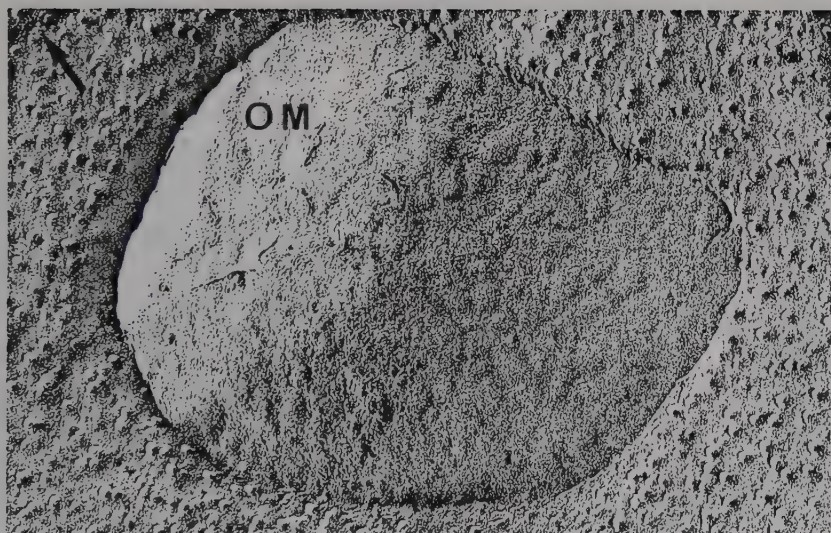


Abb. 20: Zelloberfläche von E.coli F 470; unbehandelt



Abb. 21: Zelloberfläche von E.coli F 470 nach indirekter Markierung mit Normal-Kaninchen-IgG und anti-Kaninchen-IgG-Antikörper/Ferritin-Konjugat.
Kontrolle zu der indirekten Markierung



Abb. 22: Zelloberfläche von E.coli F 614 nach direkter Beladungsmethode.

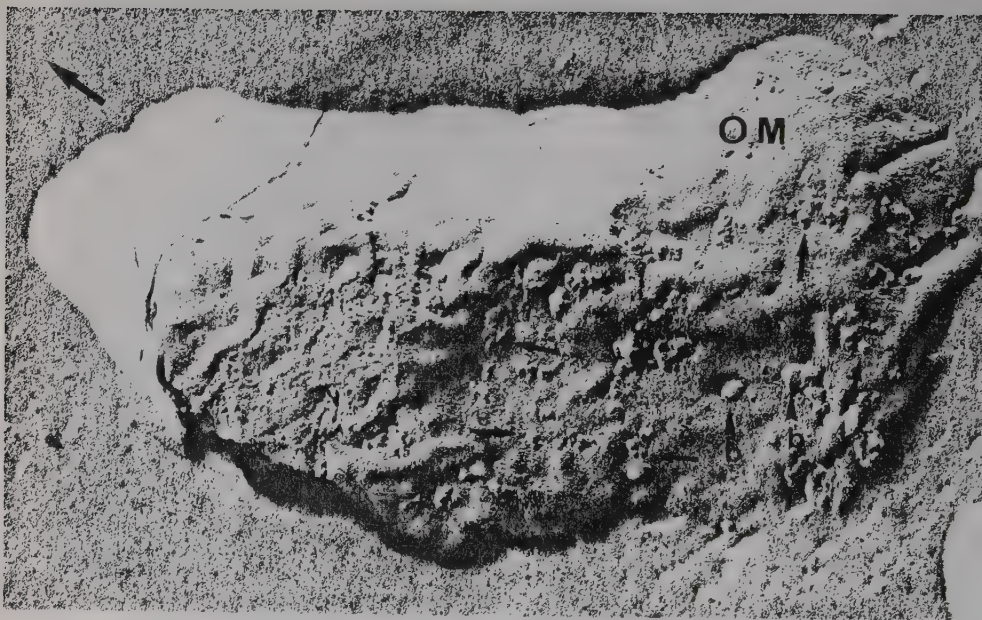


Abb. 23: Zelloberfläche von *E.coli* F 614 nach indirekter Markierungs-Technik.

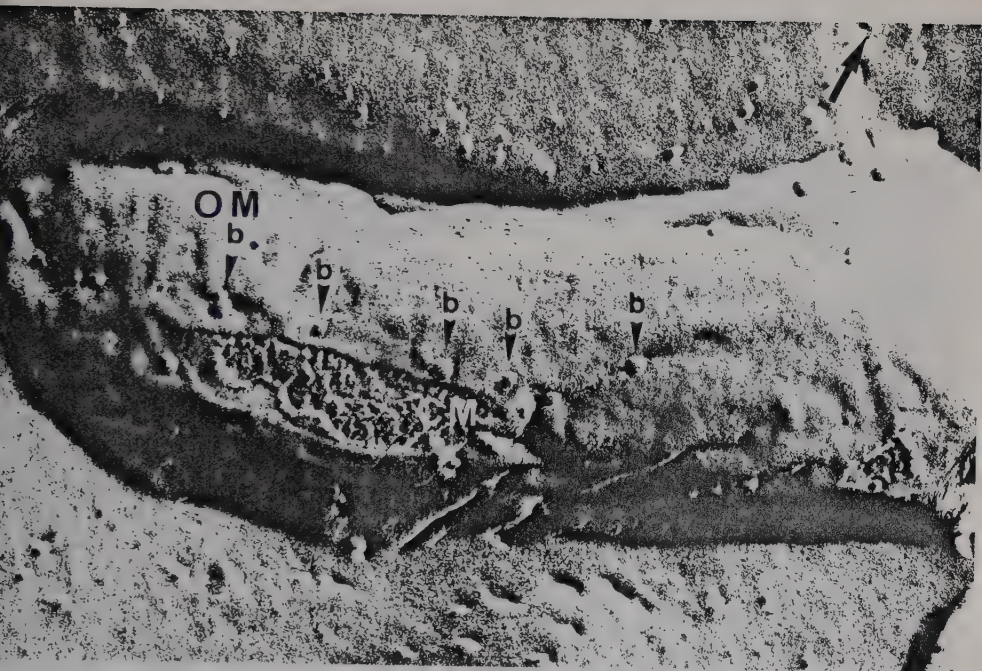


Abb. 24: Zelloberfläche von E.coli F 614, unbeladen.
Kontrolle zu Abb. 22

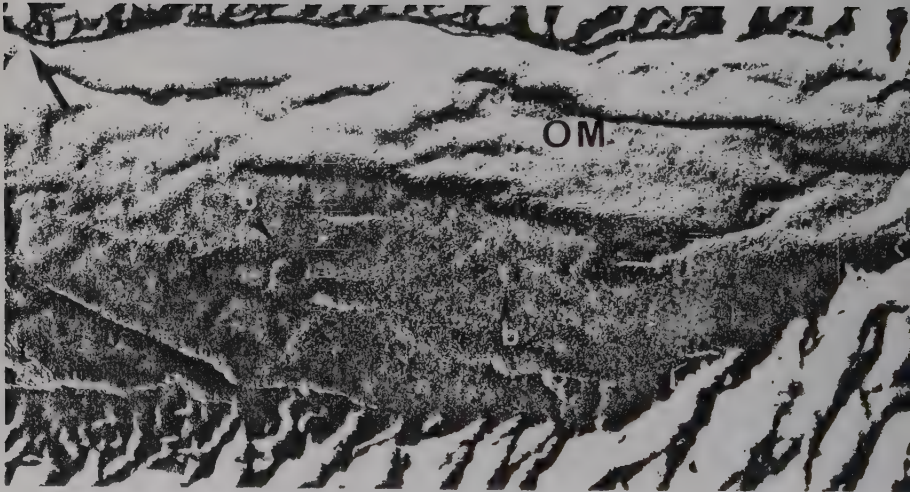


Abb. 25: Zelloberfläche von E.coli F 614 nach
indirekter Markierung.

Kontrolle zu Abb. 23



Abb. 26: Zelloberfläche von E.coli F 1283 nach direkter Beladung.

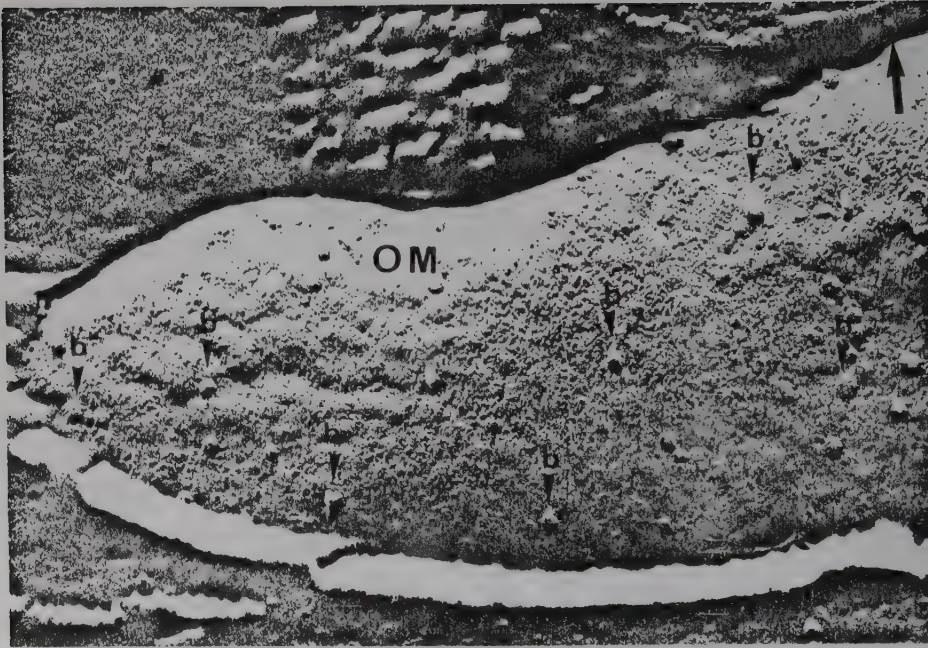


Abb. 27: Zelloberfläche von E.coli F 1283 nach der indirekten Beladung mit ECA-IgG.

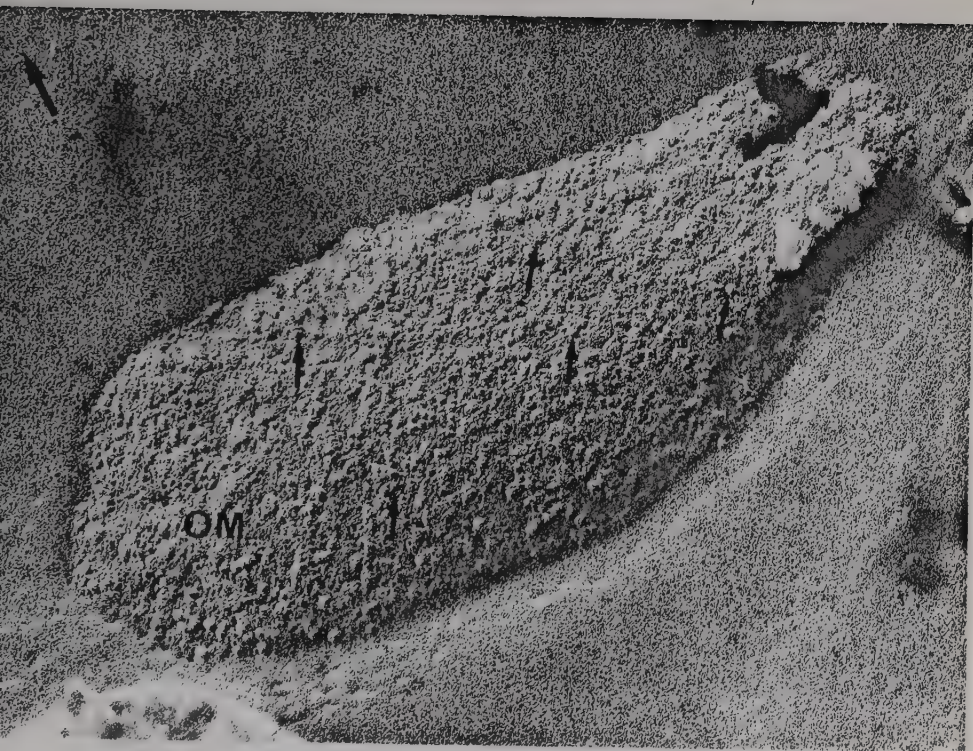


Abb. 28: Zelloberfläche von E.coli F 2387 nach der direkten Markierungs-Methode.

2.6. Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen von Fluoreszein-beladenen Bakterien

Die Zellhülle von E.coli F 470 (Abb. 29) zeigt nach der Markierung eine gleichmäßige, intensive Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu lassen die Bakterien des Stammes F 614 (Abb. 30) nur eine schwache Grundfluoreszenz erkennen. Stellenweise ist das Phänomen des "Capping" zu sehen, wo an bestimmten Stellen der Bakterienoberfläche die Fluoreszenz stärker in Erscheinung tritt. Abb. 31 zeigt ein Gemisch der beiden Fluoreszein-markierten Stämme F 470 und F 614. Hier lassen sich die Stämme eindeutig voneinander unterscheiden. Die Fluoreszenz von F 470 überstrahlt fast die des Stammes F 614, lässt aber noch die zwei verschiedenen Bakterienstämme erkennen. Dagegen erscheinen die Bakterien des Stammes F 1283, der als rfe⁻-Mutante kein ECA besitzt, völlig ohne Fluoreszenz (Abb. 32). Durch einen kleinen Trick ist es möglich, die nicht fluoreszierenden Bakterien unter UV-Bestrahlung im Mikroskop zu erkennen.

Durch Zugabe von 2 µl fluoreszierender Antikörperlösung im Anschluß an die letzte Waschung zu dem Bakteriensediment wird der Hintergrund im Mikroskop so aufgehellt, daß unmarkierte Bakterien erkennbar werden. Das ist auch die Ursache für die verschiedenen Hintergrundfärbungen bei den einzelnen Aufnahmen. Abb. 33 verdeutlicht die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten der drei E.coli-Stämme des Serotyps O8.

Die Ergebnisse der Markierung der E.coli O14-Mutanten F 2387 und F 1327 decken sich mit den für die O8-Serotypen beschriebenen. Zusätzlich kann bei Stamm F 2387 (Abb. 34) festgestellt werden, daß die Fluoreszenz-Intensität in den neu entstehenden Zellwänden sich teilender Bakterien am stärksten ist. Dies könnte bedeuten, daß der ECA-Gehalt an Stellen der Zellwandsynthese am größten ist oder ECA dort besonders leicht zugänglich ist.



Abb. 29: Bakterien des Stammes E.coli F 470 nach Markierung mit Fluoreszein-markierten Antikörpern.

Belichtungszeit: 2 Minuten

Endvergrößerung 5200 : 1



Abb. 30: Bakterien des Stammes E.coli F 614 nach Beladung mit Fluoreszein-markierten Antikörpern.

Belichtungszeit: 45 Sekunden

Endvergrößerung: 3276 : 1

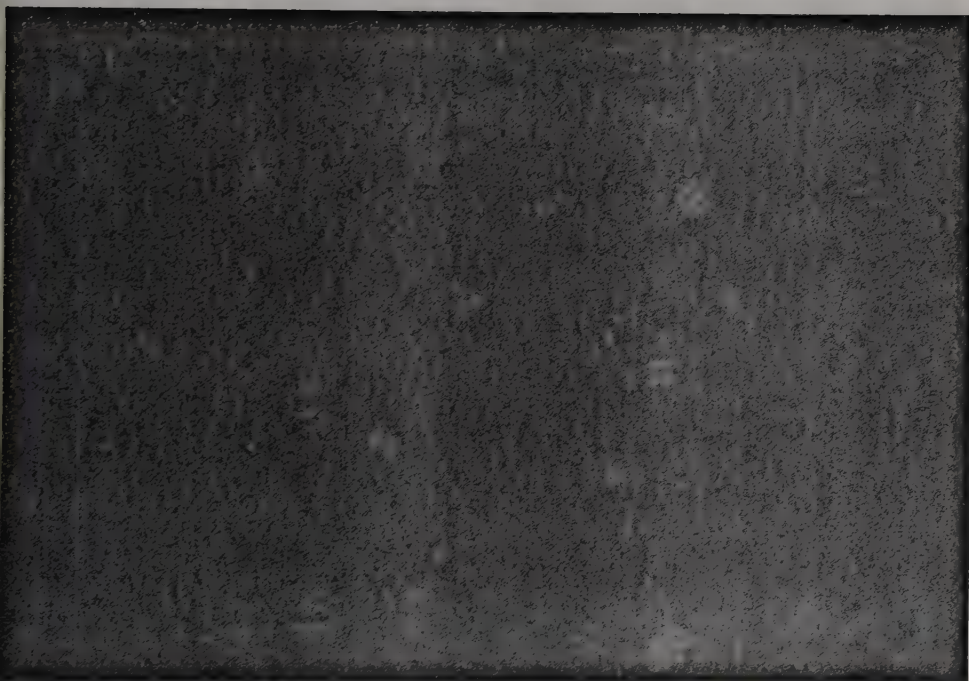


Abb. 31: Gemisch von fluoreszierenden Bakterien der
Stämme E.coli F 614 und E.coli F 470.

Belichtungszeit: 30 Sekunden

Endvergrößerung: 3276 : 1

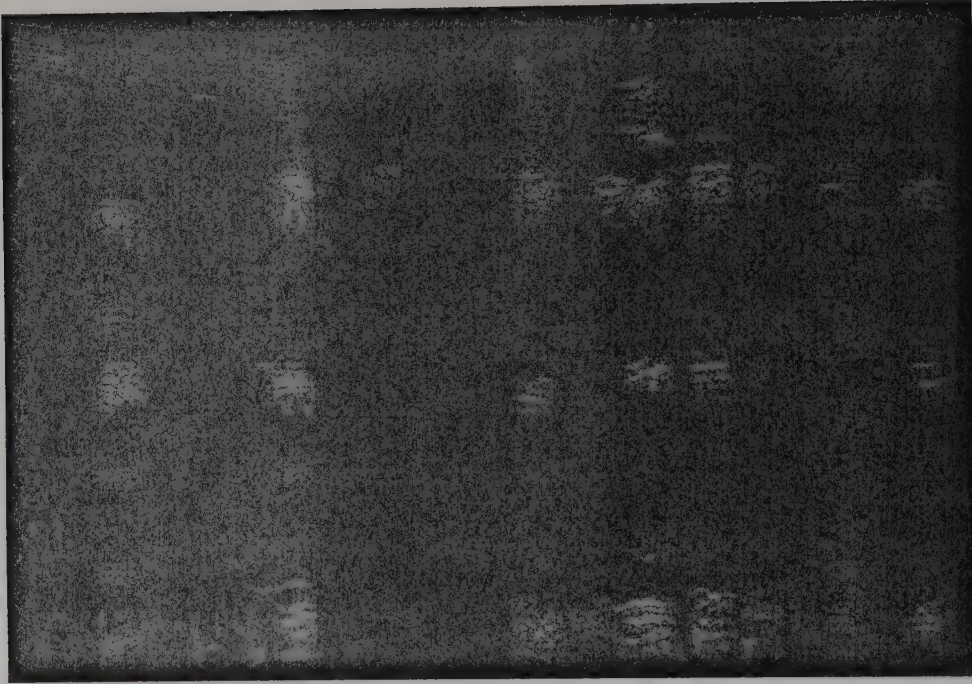


Abb. 32: Bakterien des Stammes E.coli F 1283 nach Beladung
mit Fluoreszein-gekoppelten Antikörpern.
Belichtungszeit: 45 Sekunden
Endvergrößerung: 3276 : 1

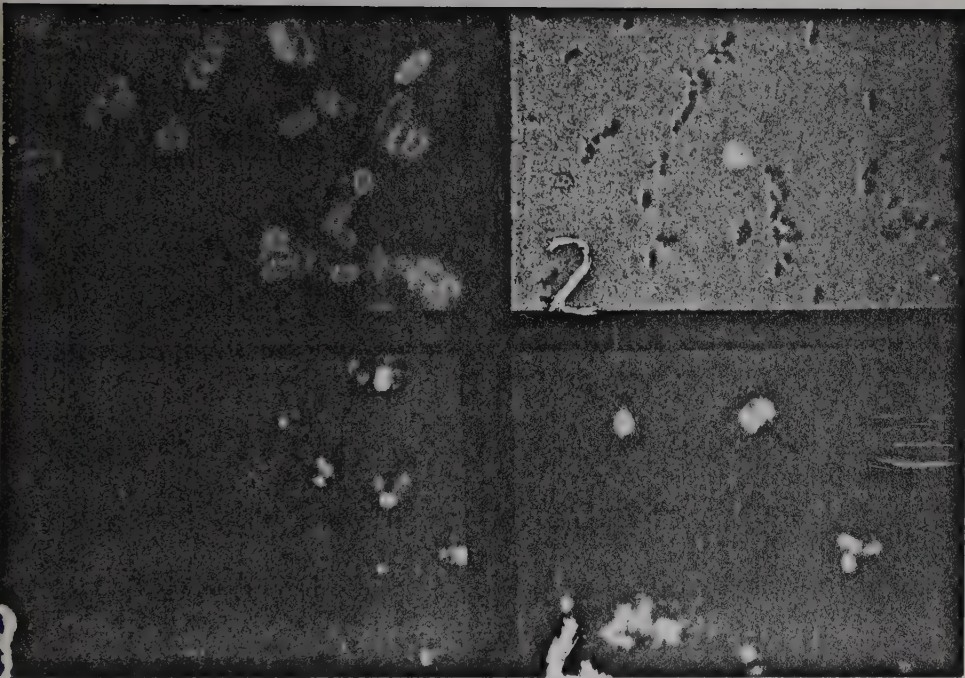


Abb. 33: Zusammenstellung der vorangegangenen Aufnahmen:

oben links (1) E.coli F 470

unten links (3) E.coli F 614

oben rechts (2) E.coli F 1283

unten rechts (4) Gemisch E.coli F 470 und E.coli F 61

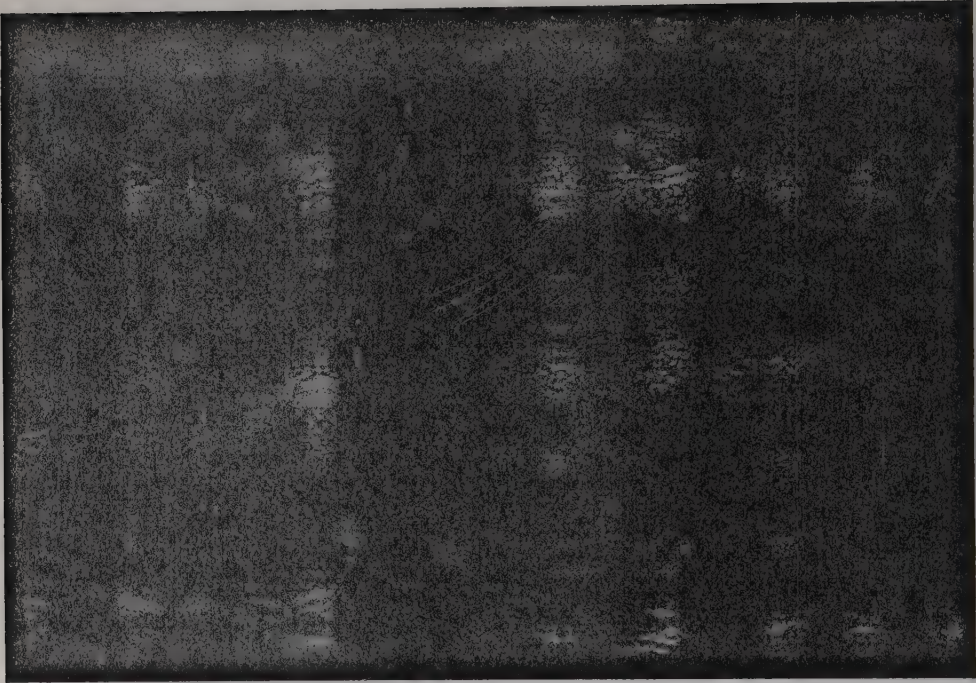


Abb. 34: Bakterien des Stammes E.coli F 2387 nach Beladung
mit Fluoreszein-markierten Antikörpern.

Belichtungszeit: 30 Sekunden

Endvergrößerung: 3276 : 1

2.7. Markierungsuntersuchungen von Sphäroplasten und Protoplasten von Proteus mirabilis Bakterien

Durch Penicillin-Behandlung der Proteus mirabilis-Stämme D52, VI (28) und 19 (79) wurden stabile Protoplasten L-Formen LD 52 und L VI bzw. Sphäroplasten UL 19 erhalten, die uns von Dr. J. Gmeiner, Darmstadt, zugänglich gemacht wurden.

L-Form Sphäroplasten besitzen eine defekte Zellwand, in der jedoch das Strukturpolymer Murein in gleicher chemischer Zusammensetzung und mit gleicher Quervernetzung vorkommt wie in normalen Proteus-Bakterien. Dagegen haben die stabilen Protoplasten L-Formen von Proteus mirabilis unter der Einwirkung von Penicillin ihre Zellwand verloren und sind unempfindlich gegen Penicillin geworden. Da Protoplasten und Sphäroplasten unterschiedlichen Gehalt an Material der äußeren Zellwand aufweisen, wurden an ihnen Markierungsuntersuchungen mit Ferritin- und Fluoreszein-gekuppelten Antikörpern unternommen, um zu klären, in welcher Membran oder Schicht ECA lokalisiert ist. Abb. 35 stellt einen Protoplasten nach indirekter Ferritin-Markierung dar. Seine cytoplasmatische Membran zeigt, genau wie die Kontrolle (Abb. 36), keine Beladung mit Ferritinpartikeln. Der Sphäroplast dagegen hat Ferritin angelagert (Abb. 37). Die Anlagerung kann nicht auf unspezifische Adsorption zurückgeführt werden, da die Kontrolle eine glatte, ferritinfreie Oberfläche zeigt (Abb. 38). Auch bei den Sphäroplasten sind "blebs" erkennbar, die bei den Protoplasten fehlen. Dies unterstützt die Vermutung von Smit et al. (129), daß "blebs" Vesikel mit Material der äußeren Membran darstellen. Protoplasten besitzen keine äußere Membran mehr, können daher auch keine "blebs" ausbilden.

Von den Bakteriensedimenten nach indirekter Ferritin-Markierung wurden Proben in Epoxyharz eingebettet und Ultradünnschnitte hergestellt. Auf EM-Bildern (Abb. 39) dieser Schnittpräparate zeigen Protoplasten keine Ferritinpartikel mehr angelagert. Dagegen läßt Abb. 40 Ferritinpartikel auf der äußeren Seite der Zellhülle eines Sphäroplasten erkennen. Trotz mehrerer Versuche gelang es nicht, intakte, beladene Zellen herzustellen und zu fotografieren. Dadurch, daß die Sphäroplasten ausliefen, wird erkennbar, daß die Ferritinpartikel nicht an der inneren Seite der Zellhülle angelagert sind, sondern sich immer an der äußeren Seite der Zellhülle befinden. Die Herstellung der Ultradünnschnitte übernahm Dr. J.R. Golecki (Universität Freiburg). Bei Untersuchungen der Proto- und Sphäroplasten nach Markierung mit Fluoreszeinkonjugierten Antikörpern fluoreszierten nur die letzteren (Abb. 41). Lebende Bakterien waren an ihrer teilweise fluoreszierenden Zellwand zu erkennen. Die Intensität entsprach etwa der des Stammes E.coli F 614 (Abb. 30). Während die Bakterien noch lebten, konnte im Mikroskop beobachtet werden, wie sich fluoreszierende Membranfragmente bewegten, zusammenlagerten und wieder in mehrere Stücke zerfielen. Nach etwa 2-minütiger UV-Bestrahlung war die Beweglichkeit verschwunden und nach kurzer Zeit zerfielen die Zellen, so daß nur noch amorphe, fluoreszierende Partikel zurückblieben. In Abb. 41 sind eine lebende Zelle, zwei gerade zerfallende Zellen und als Verunreinigung Reste von geborstenen Zellen zu erkennen. Protoplasten konnten auch durch Hintergrundaufhellung nicht fotografiert werden, da im UV-Licht die Zellen sofort zerfielen, bevor mit den relativ langen Belichtungszeiten Aufnahmen gemacht werden konnten.

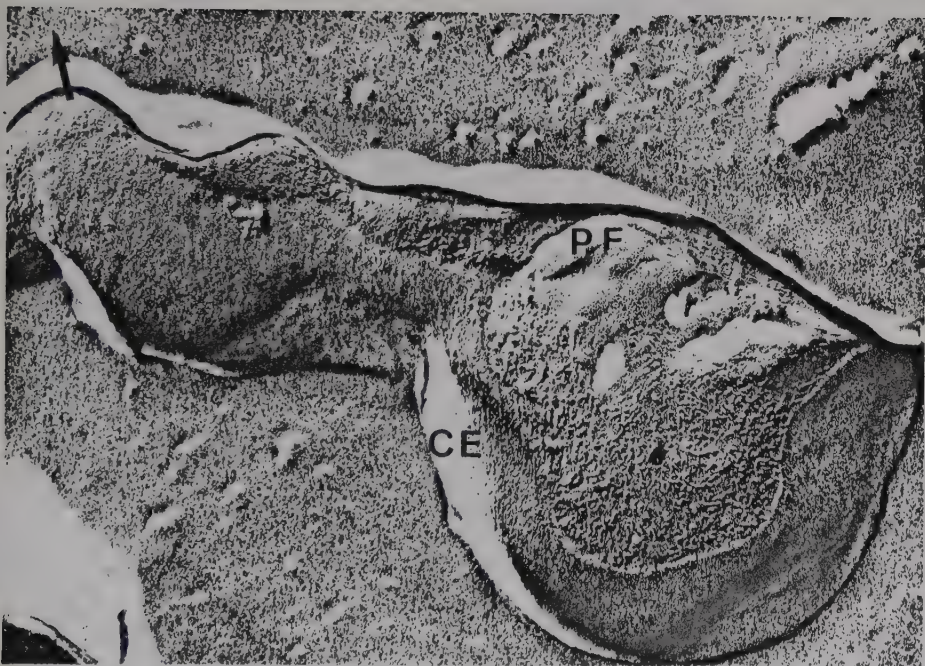


Abb. 35: Zelloberfläche eines Protoplasten von
Proteus mirabilis nach indirekter Ferritin-Markierung.

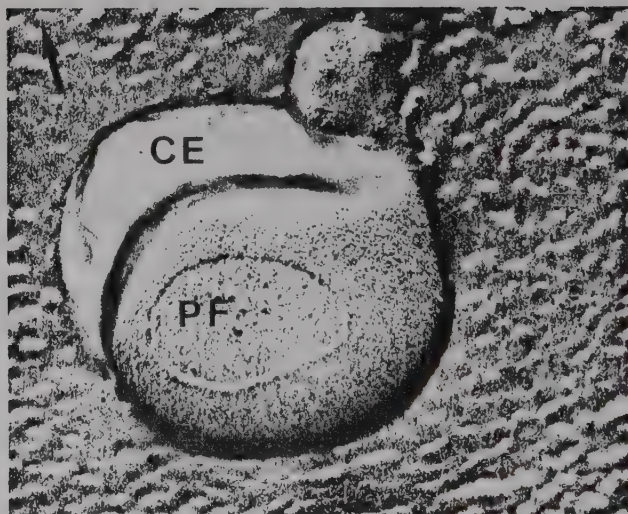


Abb. 36: Zelloberfläche eines Protoplasten von *Proteus mirabilis* nach indirekter Beladung als Kontrolle zu Abb. 35.

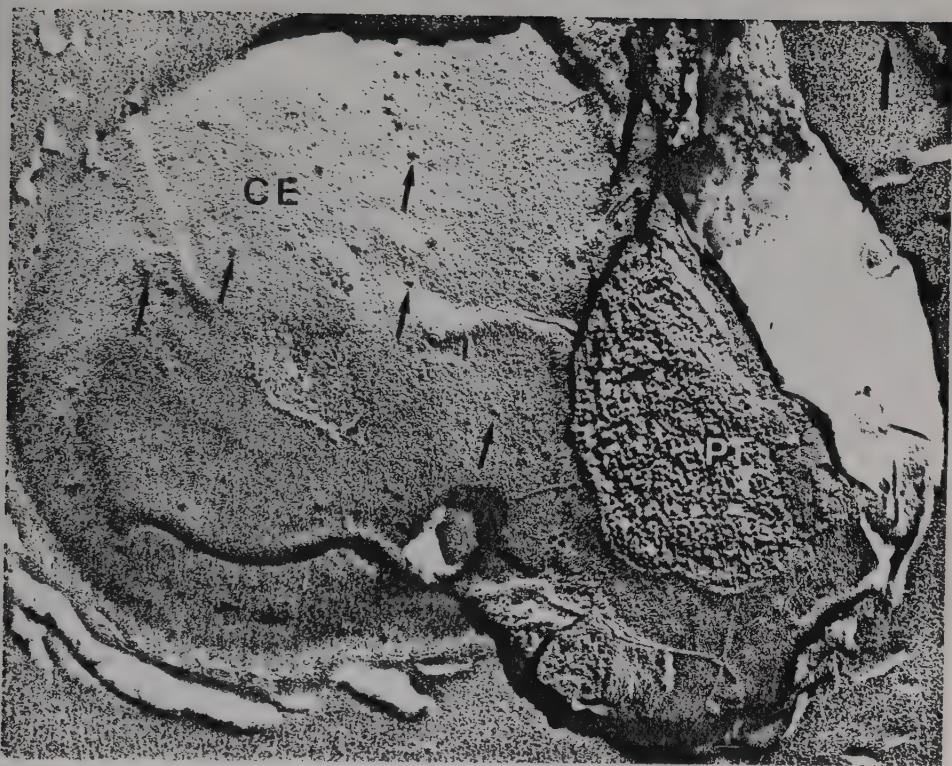


Abb. 37: Zelloberfläche eines Sphäroplasten von Proteus mirabilis nach der indirekten Markierungsmethode mit Ferritin-konjugierten Antikörpern.

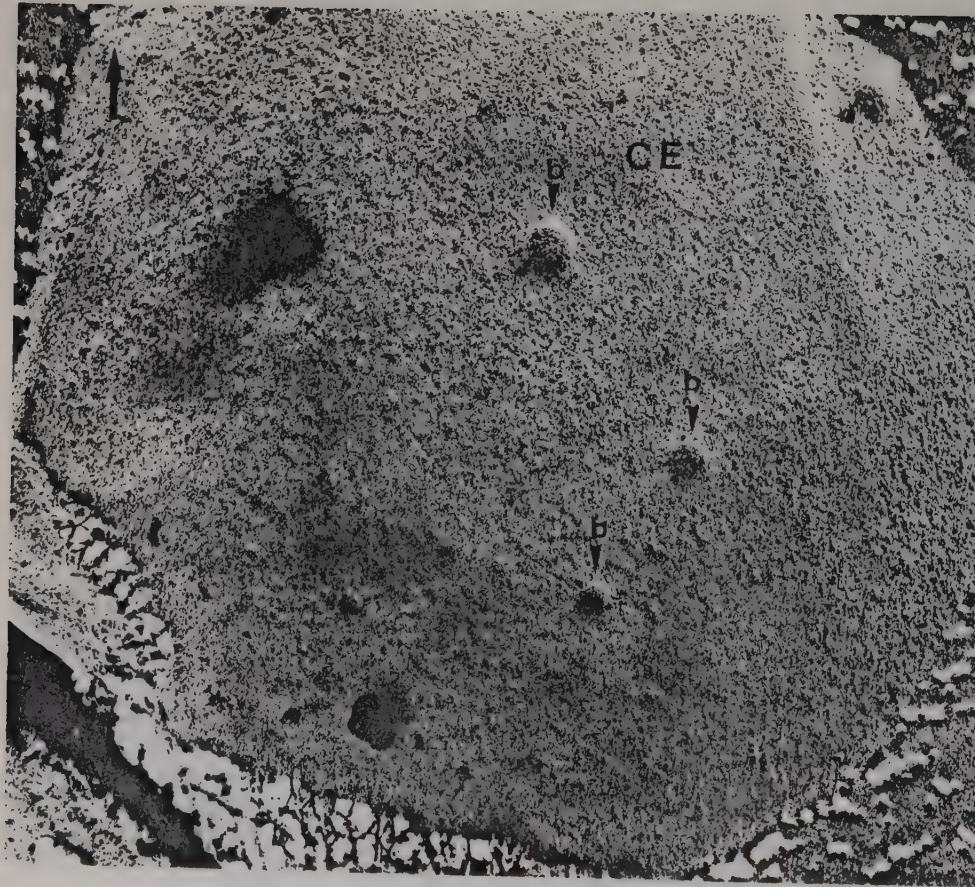


Abb. 38: Zelloberfläche eines Sphäroplasten von Proteus mirabilis nach indirekter Beladung mit Ferritin-konjugierten Antikörpern als Kontrolle zu Abb. 37.

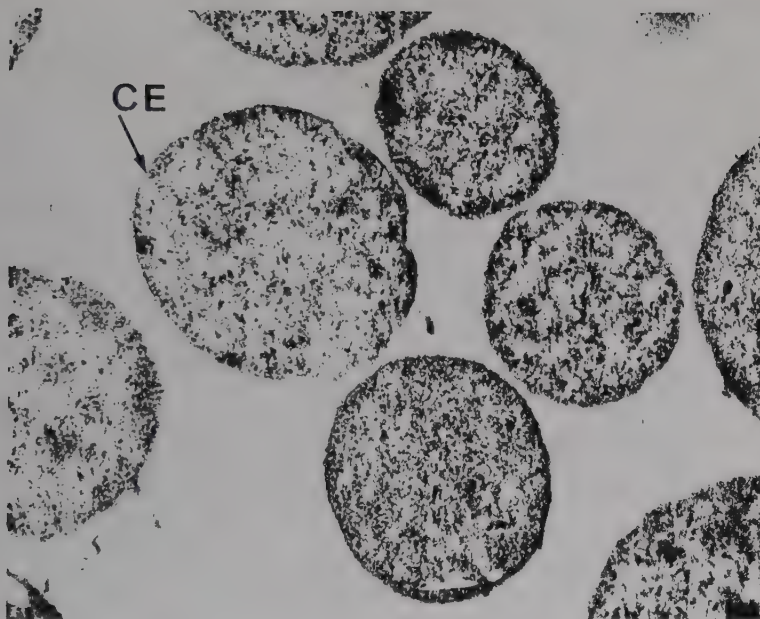


Abb. 39: Ultradünnschnitt von Protoplasten von
Proteus mirabilis nach indirekter Ferritin-Markierung.

Endvergrößerung: 58 000 : 1



Abb. 40: Ultradünnschnitt eines Sphäroplasten von Proteus mirabilis nach indirekter Markierungstechnik.

Endvergrößerung: 58 000 : 1

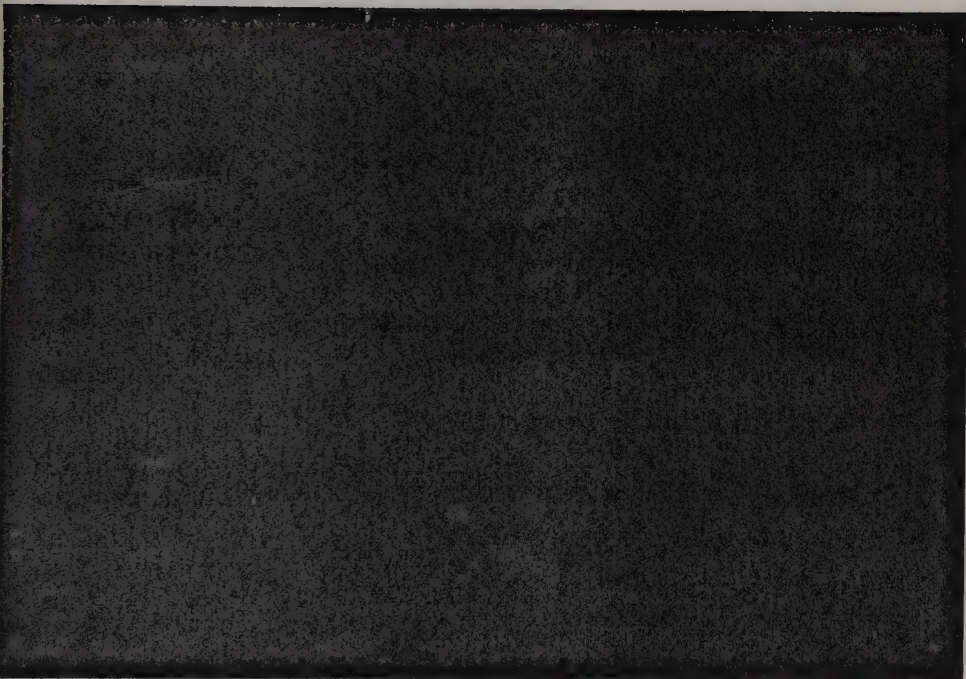


Abb. 41: Sphäroplasten von Proteus mirabilis nach Beladung mit Fluoreszein-markierten Antikörpern.

Belichtungszeit: 2 Minuten

Endvergrößerung: 5200 : 1

2.8. ECA-Gehalt von Proteus mirabilis Sphäro- und Protoplasten

Der ECA-Gehalt der äußeren Membran wurde außerdem durch serologische Untersuchungen bestätigt. Zur Bestimmung des ECA-Gehaltes in Sphäroplasten und Protoplasten wurden Überstände hitzebehandelter Bakterienstämme als ECA-Quelle zum Beladen von Erythrozyten benutzt. Dieselben Extrakte wurden auch als mögliche Inhibitoren in ECA-spezifische Hämagglutinationssysteme eingesetzt. Um auch evtl. im Cytoplasma oder relativ fest in der cytoplasmatischen Membran gebundenes ECA erfassen zu können, wurden auch die wässrigen Phasen nach Phenol/Wasser-Extraktion in die passive Hämagglutination und deren Hemmung, sowie in die Immunelektrophorese eingesetzt.

Die erhaltenen ECA-Titer, sowie die Ergebnisse der Präzipitation sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Fraktionen A - D der Wildtyp-Stämme (s. Tabelle 9) weisen sehr hohe ECA-Titer auf und zeigen auch in der Immunelektrophorese mit einem hochtitrigen ECA-Antiserum gute Präzipitationslinien. Der Sphäroplast UL 19, der noch Reste der äußeren Membran besitzt zeigt stark reduzierte ECA-Titer in der passiven Hämagglutination und eine nur schwach angedeutete Präzipitation in der Immunelektrophorese. Werden jedoch höhere Konzentrationen der Bakterienüberstände bzw. des Phenol/Wasser-Extraktes von UL 19 zur Erythrozyten-Sensibilisierung eingesetzt, dann tritt ein deutlicher Anstieg der Hämagglutinationstiter auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem Sphäroplasten UL 19 wurden mit den stabilen Protoplasten L-Formen mit einer Ausnahme (B und L VI) - keine ECA-spezifischen Titer in der passiven Hämagglutination beobachtet und ebenso weder Hemmung noch Präzipitation.

Spezies	Titer in der passiven Hämagglutination				Präzipitation	Hemmstoffkonzentration in der Hämagglutina- tionshemmung (µ/ml)
	A	B	C	D		
Wildtyp D52	5120	5120	5120	10240	++	62.5
" VI	5120	5120	5120	10240	++	62.5
" 19	5120	5120	2560	5120	++	62.5
Sphäroplast UL 19	320	1280	160	1280	+	62.5
stabile Protoplasten						
L-Formen LD 52	10	10	10	10	-	> 250
LVI	10	160	10	10	-	> 250

Beladung der Erythrozyten (25 µl Erythrozyten-Sediment) mit:

A : 100 µl Überstand erhitzter Bakterien

B : 1 ml Überstand erhitzter Bakterien

C : 100 µg lyophilisiertes Material der wässrigen Phase der Phenol/Wasser-Extraktion

D : 400 µg lyophilisiertes Material der wässrigen Phase der Phenol/Wasser-Extraktion

Tabelle 9: Bestimmung des ECA-Gehaltes in *Proteus mirabilis*-Stämmen durch serologische Tests.

2.9. Zusammenfassung

Das immunogene und nicht-immunogene ECA ist ein Bestandteil der äußeren Membran. Es ist auf der Außenseite der Membran lokalisiert, wo es Antikörpern zugänglich ist. Weniger gut erreichbar ist ECA für Antikörper, wenn zusätzlich O-Antigene vorhanden sind. ECA konnte weder auf der inneren Seite der Zellhülle (Ultradünnschnitte) noch in der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden. Die Beobachtung, daß ECA kein Bestandteil der cytoplasmatischen Membran ist, wird durch serologische Untersuchungen von Proto- und Sphäroplasten von

Proteus mirabilis unterstützt. In Überständen erhitzter Bakterienkulturen konnten nur bei Sphäroplasten geringe Mengen an ECA (in den Resten ihrer äußeren Membran) nachgewiesen werden. In Protoplasten ist ECA jedoch, wenn überhaupt, nur in Spuren enthalten.

3. Radioaktive Markierung von ECA und dessen Isolierung

3.1. Einleitung

Haptenisches ECA besteht, wie auf Seite 14 diskutiert, aus einer linearen Kette von α -1,4-gebundenen alternierenden Einheiten von N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-mannosaminuronsäure (76). D-Mannosaminuronsäure ist ein bisher nur aus Bakterien-Inhaltsstoffen bekannter Zucker, der leicht durch Hochspannungselektrophorese charakterisiert werden kann (81). Beide Aminozucker von ECA können durch Wachstum der Bakterien in [^{14}C]-GlcNAc radioaktiv markiert werden (57). Durch eine vergleichende Analyse der Lipopolysaccharide von genetisch eng verwandten Mutanten wurde versucht, eine Aussage darüber zu erhalten, ob bei ECA-immunogenen Stämmen eine ECA-Bindung an den R-Core nachweisbar ist.

3.2. Bakterienwachstum in Anwesenheit von radioaktivem [^{14}C]-N-Acetyl-D-glucosamin

Für die folgenden Untersuchungen wurden genetisch verwandte Bakterienstämme ausgewählt, die bereits bei früheren Untersuchungen eingesetzt wurden (83,120,121). Sie besitzen alle denselben R1-Core, haben aber verschiedene Gen-Defekte und unterscheiden sich daher in der Anwesenheit bzw. der Immunogenität des ECA (s. Tabelle 10).

E C A				
Stamm-Nr.	Spezies/Serotyp	Vorkommen	Immunogenität	Gendefekte
F 470	<u>E.coli</u> O8 ⁻ :K27 ⁻	+	+	<u>rfb</u> ⁻
F 614	<u>E.coli</u> O8 ⁻ :K27 ⁻	+	-	<u>rfaL</u> ⁻
F 1283	<u>E.coli</u> O8 ⁻ :K27 ⁻	-	-	<u>rfe</u> ⁻
SH 94	<u>Sal.montevideo</u>	+	-	Wildtyp

Tabelle 10: Zusammenstellung der untersuchten Bakterien

Die Mutanten F 470 und F 614 wurden von E.coli E 56b erhalten (119). Sie besitzen beide ECA, aber nur beim ersten Stamm ist es immunogen. Der ECA-negative Stamm F 1283 ist ein E.coli - Hybrid, der durch Einführung eines defekten rfe⁻ -Genclusters

von einem Salmonella montevideo Hfr-Donor in das Chromosom von E.coli 08:K27 erhalten wurde (121). Als Vergleichsstamm wurde der Salmonella montevideo Wildtyp-Stamm SH 94 eingesetzt, der haptenisches ECA besitzt und der von Männel (75) zur Isolierung von ECA benutzt wurde.

Die drei E.coli-Stämme wurden in 1 l - Kulturen mit A3-Medium (Difco) in Gegenwart von 0.4% Glucose und 50 μ Ci N-Acetyl-D-1- 14 C]-glucosamin gezüchtet. Durch photometrische Dichtebestimmung bei 600 nm wurde das Wachstum der Bakterien bei 37° in konstanten Zeitabständen gemessen (57). Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase - nach etwa 3.5 Stunden - wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Bakterien lyophilisiert, ihr Trockengewicht (TG) bestimmt und die aufgenommene Radioaktivität im Tri-Carb (s. Tabelle 10) gemessen. Diese Werte stellen den 100%-Wert für die folgenden Fraktionierungen dar. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden jeweils 5 μ l der zu bestimmenden Probe zu 10 ml Scintillationslösung gegeben und dann so lange geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde anschließend im Tri-Carb auf 14 C]-Radioaktivität gemessen.

3.3. PCP-Extraktion zur Isolierung der radioaktiv-markierten R-Lipopolysaccharide

Getrocknete Bakterien aus den Züchtungen in Anwesenheit von radioaktivem Glucosamin wurden nach dem Phenol/Chloroform/Petroläther-Verfahren (2:5:8 / v:v:v) extrahiert (23). Das Extraktionsschema ist in Abb. 42 dargestellt.

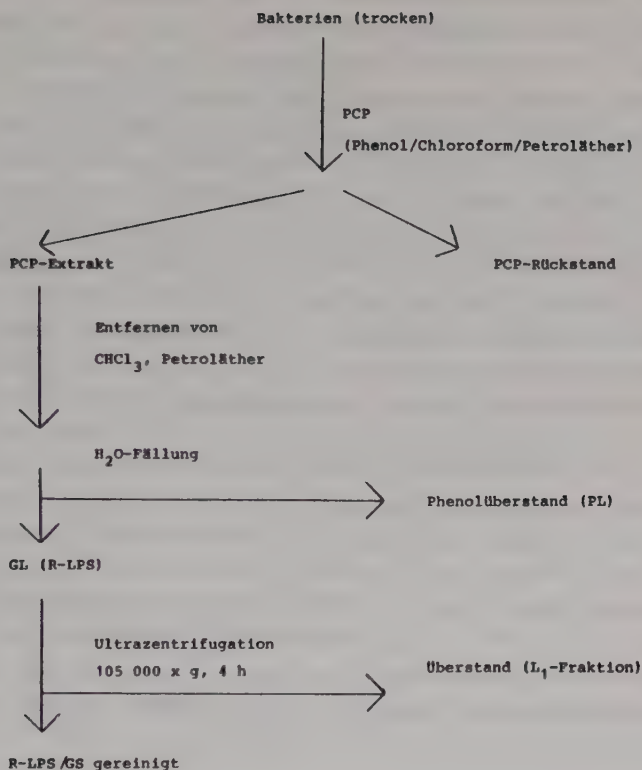


Abb. 42: Extraktionsschema zur Isolierung von R-Lipopolysacchariden modifiziert nach Galanos (23)

Durch die PCP-Methode gewonnenes Lipopolysaccharid von Stämmen mit nicht-immunogenem ECA zeigt keine serologische Aktivität mit ECA-Antiseren (83), während LPS von ECA-immunogenen Stämmen serologische ECA-Spezifität enthält. Der relativ hohe Gehalt an Chloroform und Petroläther im Extraktionsgemisch verhindert, daß Nukleinsäuren und Proteine mit-extrahiert werden. Aus dem PCP-Extrakt wurden am Rotationsverdampfer bei Temperaturen unter 40° Chloroform und Petroläther entfernt, nachdem vorher ungelöste Bakterienbestandteile abzentrifugiert worden sind. Durch vorsichtige, tropfenweise Zugabe von Wasser zu der verbliebenen phenolischen Lösung konnte LPS ausgefällt werden. Es wurde nur soviel Wasser zugegeben, daß keine Phasentrennung eintrat und eine möglichst vollständige LPS-Ausfällung erreicht wurde. Das ausgefallene LPS wurde dann mit Äther gewaschen, lyophilisiert, ausgewogen und auf seine Radioaktivität hin gemessen. Nach Suspension in Wasser wurde das LPS (GL-Fraktion) ultrazentrifugiert (105 000 x g; 4 h) und das Sediment als gereinigtes R-LPS weiter verarbeitet. In Tabelle 11 sind die Mengen der einzelnen Fraktionen und die aufgenommene Radioaktivität der E.coli-Stämme einander gegenübergestellt. Rund 20% der aufgenommenen Radioaktivität werden in der R-LPS/GS-Fraktion wiedergefunden.

Fraktionen	F 470			F 614			F 1203		
	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)
Bakterien	33	100	450	28	100	400	40	100	408
PCP-Extrakt	7.9	23.9	n.b.	7.5	26.7	n.b.	13.2	33	n.b.
PL	1.2	3.6	n.b.	0.6	2.2	n.b.	0.8	2	n.b.
GL	6.8	20.7	13.2	6.7	23.6	12	10.4	26	15
LPS/GS	6.5	19.7	10.9	6.2	22.2	10.5	9	22.7	11.6
L ₁ -Fraktion	0.1	0.3	~1	0.1	0.4	~1	~0.1	0.2	~1
PCP-Rückstand	~20	~60	~380	~18	~65	~350	~25	~62	~350

Tabelle 11: [¹⁴C]-Gehalt (cpm x 10⁻⁶) und Trockengewicht (TG) der einzelnen Fraktionen nach PCP-Extraktion.

3.4. Essigsäure-Degradierung der R-Lipopolysaccharide zur Isolierung der Core-Oligosaccharide

Gereinigtes [¹⁴C]-markiertes R-LPS (LPS/GS) der drei Bakterienstämme wurde für weitere Untersuchungen mit unmarkiertem LPS/GS im Verhältnis von 1:10 gemischt. Unmarkiertes LPS/GS stammte aus Bakterien, die nach der oben beschriebenen Methode, aber in Abwesenheit von [¹⁴C]-N-Acetyl-D-glucosamin gezüchtet und

extrahiert wurden. Durch Hydrolyse mit 1%iger Essigsäure (1 h; 100°) wurde die ketosidische Bindung zwischen KDO und Lipid A gespalten (66) und Lipid A dann durch Zentrifugation vom Core-Oligosaccharid abgetrennt. Der Überstand wurde lyophilisiert, in Wasser aufgenommen und zweimal rezentrifugiert. Nach erneuter Lyophilisation wurde das Trockengewicht bestimmt und die Radioaktivität gemessen. In Tabelle 12 sind die für R-LPS, Lipid A und Core-Oligosaccharid der E.coli-Stämme erhaltenen Werte zusammengefaßt.

Stamm	Lipopolysaccharid			Core-Oligosaccharid			Lipid A		
	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)	cpm x 10 ⁻⁶	%	TG (mg)
F 470	6.0	100	120	0.55	9.2	65	5.0	83.3	38
F 614	6.7	100	109	0.45	6.7	58	6.0	89.5	40
F 1283	5.6	100	90	0.36	6.4	45	4.5	80.5	40

Tabelle 12: Radioaktivität (cpm x 10⁻⁶) und Trockengewicht (TG) der Fraktionen nach Essigsäure-Degradierung von R-LPS/GS.

Das Core-Oligosaccharid des Stammes F 470 weist eine höhere Radioaktivität auf als das der Stämme F 614 und F 1283. Der Unterschied ist allerdings gering, er beträgt etwa 50%. Im Core-Oligosaccharid werden beim Stamm F 470 nur knapp 10% der Gesamtradioaktivität des R-LPS wiedergefunden. Bei den beiden übrigen Stämmen sind es nur etwas über 6%. Der Hauptanteil der Radioaktivität, nämlich über 80%, steckt im Lipid A.

3.5. Hochspannungs-Papierelektrophoretische Analyse zum Nachweis von Mannosaminuronsäure

Vor der Hydrolyse und der Hochspannungs-Papierelektrophorese der Hydrolysate wurden die Core-Oligosaccharid-Fractionen der E.coli-Stämme durch DEAE-Cellulose Chromatographie gereinigt (58). Als Elutionsmittel diente Ammonium-Acetat-Puffer mit linearem Konzentrations-Gradienten. Abb. 43 zeigt die Verteilung der Radioaktivität für die Stämme F 470 und F 1283 nach Säulenchromatographie. Außerdem sind noch die Verteilung von KDO - bestimmt durch die Thiobarbitursäure-Reaktion (35) und von Neutralzuckern - bestimmt durch die Methode nach Dubois et al. (16) und Hellerqvist et al. (37) - dargestellt.

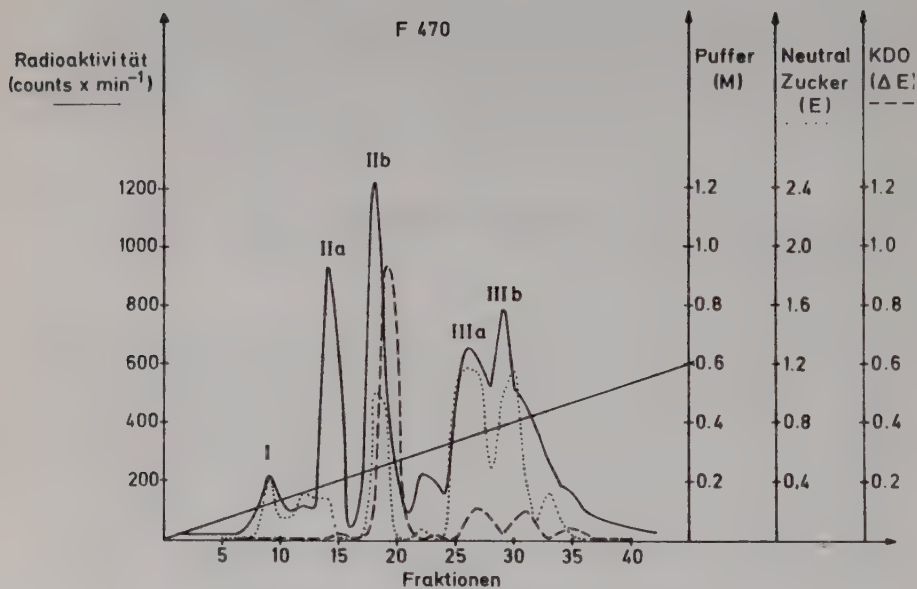


Abb. 43A: Chromatographie von Core-Oligosaccharid des Stammes F 470 über DEAE-Cellulose.

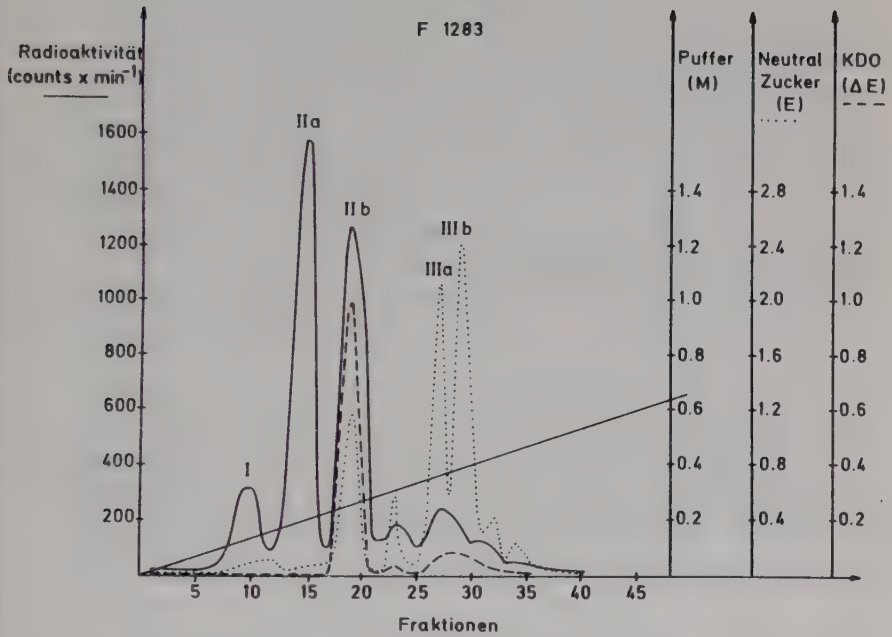


Abb. 43 B: Chromatographie von Core-Oligosaccharid des Stammes F 1283 über DEAE-Cellulose.

Zusätzliche, mit Dr. P. Kiss durchgeführte, serologische Untersuchungen ergaben, daß von allen Fraktionen aus beiden Stämmen nur die Fraktionen IIIa und IIIb von F 470 in der Immunelektrophorese mit ECA-monospezifischen Antiseren präzipitieren (s. Tabelle 13). Die Fraktion IIIa von F 470 zeigt eine geringere Präzipitationsfähigkeit als Fraktion IIIb. In der passiven Hämagglutinationshemmung besaß nur die Fraktion IIIb von F 470 eine Hemmwirkung, während selbst die höchste Hemmstoffkonzentration (625 µg/ml) der anderen Fraktionen keine Hemmung bewirken konnte. Für das R1-Antigen in allen getesteten Fraktionen III von F 470, F 1283 und F 614 betrug die Hemmstoffkonzentration 156 µg/ml. Das bedeutet, daß die R1-spezifische Determinante aller drei Mutanten die gleiche serologische Wirkung hat.

Da die Fraktionen IIIa und IIIb von F 470 mit ECA-monospezifischem Antiserum in der Immunelektrophorese präzipitierten, wurden diese beiden Fraktionen zur Fraktion III zusammengefaßt. Eine bessere Auftrennung unter den gewählten Bedingungen war nicht möglich, so daß für die Hochspannungs-Papierelektrophorese das Hydrolysat der Gesamtfraktion III eingesetzt wurde.

Fraktion	Stamm	Hemmstoffkonzentration in der passiven Hämagglutinationshemmung (µg/ml)		Präzipitation in der Immun-Elektrophorese
		ECA	R1	
III a	F470	> 625	156	+
III b	F470	78	156	++
III	F1283	> 625	156	-
III	F614	> 625	156	-

Tabelle 13: Serologische Spezifitäten der Fraktionen aus der Chromatographie an DEAE-Cellulose gegen ECA und R 1-Antigen.

Die lyophilisierten Fraktionen III wurden viermal in Methanol/Wasser aufgenommen und zur Trockene eingengt, um alle Reste an Elutionspuffer zu entfernen. Zur Freisetzung von Glucosamin und Mannosaminuronsäure wurden die Fraktionen mit 4 N HCl für 2 Stunden hydrolysiert (76). Im Exsikkator über KOH-Plättchen wurde die Salzsäure entfernt. Dann wurde das eingetrocknete Hydrolysat in wenig Wasser aufgenommen und 20 µl davon bei pH 2.8 elektrophoretisch getrennt. Nach der HVE wurden die Papierstreifen mit AgNO₃/NaOH (136) und Ninhydrin angefärbt und ihre Radioaktivität im Radiochromatogramm-Scanner ermittelt. Abb. 44 zeigt die Radioelektropherogramme von Hydrolysaten der Fraktionen III der drei E.coli-Stämme und als Vergleich dazu in der obersten Reihe [¹⁴C]-markiertes haptenisches ECA aus Salmonella montevideo SH 94. Von allen Fraktionen zeigt nur die Fraktion III von F 470 (zweite Reihe in Abb. 44) die ECA-spezifischen Bestandteile Glucosamin und Mannosaminuronsäure, die hier als Mannosaminuron vorliegt (76). Im Vergleich zu SH 94 sind die Mengen allerdings gering. Bei den Stämmen F 614 und F 1283 kommen dagegen im Hydrolysat der Core-Oligosaccharide weder Glucosamin noch Mannosaminuronsäurelaktone vor.

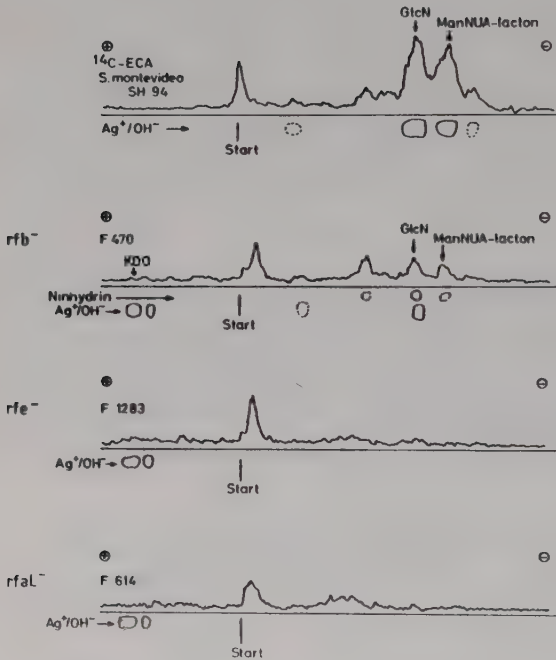


Abb. 44: Hochspannungs-Papierelektrophorese und Radioelektrophorogramme der Hydrolysate (20 μ l) der Core-Oligosaccharide von *Salmonella montevideo* SH 94, *E. coli* F 470, F 1283 und F 614 (von oben nach unten). Empfindlichkeit des Radiochromatogramm-Scanner : $E = 3 \times 10^2$

3.6. Zusammenfassung

Die Untersuchungen der isolierten LPS/GS-Fraktionen haben gezeigt, daß ein Teil des ECA im ECA-immunogenen E.coli-Stamm F 470 am Core-Oligosaccharid kovalent gebunden ist. Nach PCP-Extraktion des Stammes F 614 konnte im isolierten LPS/GS kein ECA nachgewiesen werden, obwohl dieser Stamm haptisches ECA besitzt. Wie zu erwarten, fehlten im LPS des ECA-negativen Stammes F 1283 die ECA-spezifischen Zucker N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-mannosaminuronsäure. Ergänzende Untersuchungen mit Dr. P. Kiss zeigten, daß die ECA-spezifischen Zucker nach DEAE-Cellulose-Chromatographie mit Ammonium-Acetat-Puffer als Elutionsmittel mit linearem Konzentrationsgradienten in der sauersten Fraktion (III) von F 470 (s. Abb. 43 A) gefunden wurden. Nur diese Fraktion reagierte mit monospezifischen ECA-Antiseren in serologischen Tests, wie passiver Hämagglutination, Hämagglutinationshemmung und Immunelektrophorese (58). Die entsprechenden Fraktionen von F 614 und F 1283 zeigten in denselben Tests nur R1-Spezifität, wie auch die Fraktion III von F 470. Wegen des geringen Gehalts an KDO (s. Abb. 43) in den Fraktionen III kann gesagt werden, daß das immunogene ECA sehr wahrscheinlich im Hexose-Bereich des Core-Oligosaccharides gebunden ist. Ein Vergleich der radioaktiven Peaks in den Radioelektropherogrammen des freien ECA von Salmonella monteideo SH 94 und von LPS-gebundenem ECA macht aber deutlich, daß nur wenige R1-Core-Oligosaccharide mit ECA substituiert sind.

4. LPS-, ECA- und Lipid A-Titer in Kaninchenserum gegen Essigsäure-degradierte Bakterien

4.1. Einleitung

Durch kontrollierte milde Essigsäure-Hydrolyse von Ganzbakterien können aus deren Lipopolysacchariden die R- und O-Ketten vom Lipid A-Teil abgespalten werden (24). Dabei bleibt der Lipid A-Anteil der O-Antigene in der äußeren Membran inkorporiert. Da ECA in ECA-immunogenen Bakterienstämmen kovalent an R-LPS gebunden ist, sollte die ECA-Immunogenität durch Essigsäure-Hydrolyse parallel mit der R-Immunogenität abnehmen und reziprok dazu die Lipid A-Immunogenität erst entstehen. Zur Bestätigung dieser Annahmen wurden Immunisierungsversuche mit Essigsäure (HAc)-degradierten Bakterien und parallel dazu Kontrollen mit Hitze-abgetöteten Bakterien durchgeführt.

4.2. LPS-, ECA- und Lipid A-Titer in Seren nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten Bakterien

Zur Bestimmung der Säurelabilität der ECA-Immunogenität wurden Immunisierungsversuche mit Essigsäure-degradierten Bakterien unternommen. Dazu wurden Bakterien-Suspensionen nach Galanos (24) zwei Stunden lang bei 100° mit isosmotischer 1%iger Essigsäure erhitzt und Kaninchen mit den sorgfältig gewaschenen Bakteriensedimenten i.v. immunisiert. Steigende Mengen an Antigen (0.25 ml; 0.5 ml und 1 ml; ca. 10^{10} Zellen/ml) wurden an den Tagen 0, 3 und 7 appliziert. Vor den jeweiligen Injektionen und am Tag 14 wurde

Blut aus der Ohrvene zur Titerbestimmung entnommen. Nach Komplement-Inaktivierung wurden in den Seren die ECA- und R-Titer in der passiven Hämagglutinationsreaktion, sowie die Lipid A-Titer in der passiven Hämolyse-Reaktion bestimmt.

Stamm-Nr.	Spezies / Serotyp	R-Core	ECA-Form
F 470	<u>E.coli</u> O8 ⁻ :K27 ⁻	R1	imm.
F 3111	<u>Shig.sonnei</u> Phase II	R1	imm.
F 3140	<u>Shig.boydii</u> Typ 3 ⁻	R1	imm.
F 2387	<u>E.coli</u> O14:K7	R4	imm.
F 2516	<u>E.coli</u> O14:K7 ⁻	R4	imm.

Tabelle 14: Zusammenstellung der ECA-immunogenen Bakterienstämme, die nach Essigsäure-Degradierung zur Immunisierung eingesetzt wurden.

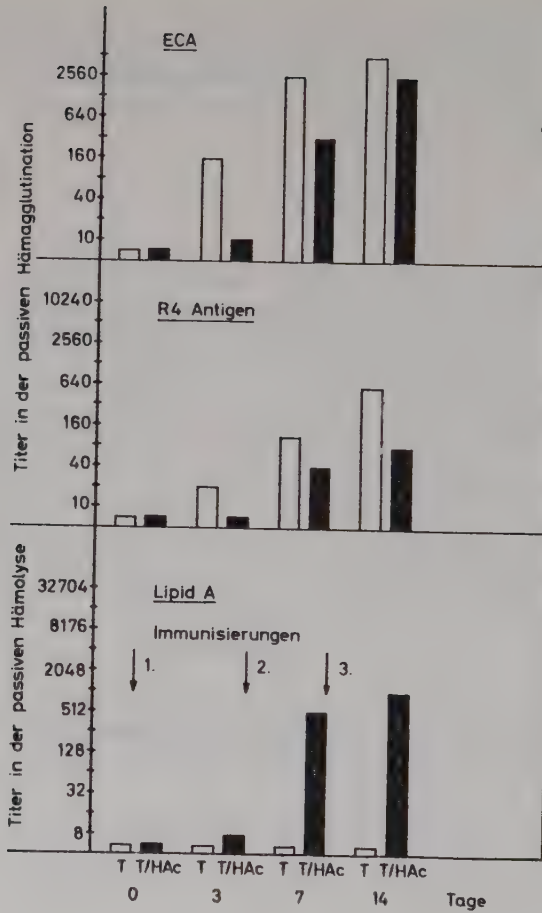


Abb. 45: ECA-, R4-Titer in der passiven Hämagglutination und Lipid A-Titer in der passiven Hämolyse in Seren nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten (T/HAc) und Hitze-abgetöteten (T) Bakterien des Stammes *E.coli* O14:K7⁻ (F 2516)

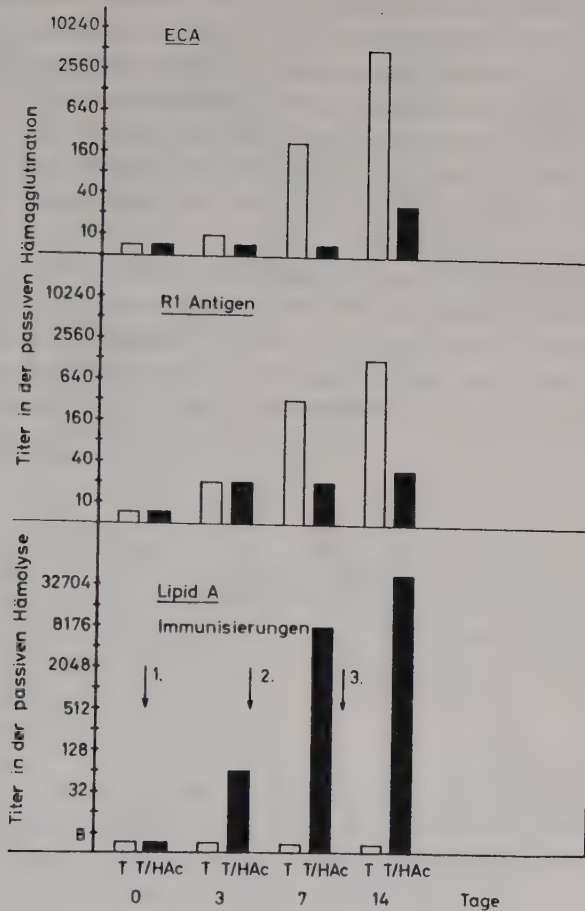


Abb. 46: ECA- und R1-Titer in der passiven Hämagglutination und Lipid A-Titer in der passiven Hämolyse in Seren nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten (T/HAc) und Hitze-abgetöteten (T) Bakterien des Stammes *Shigella boydii* Typ 3⁻ (F 3140)

Die zur Immunisierung eingesetzten Stämme sind in Tabelle 14, die erhaltenen Titer in den Abbildungen 45 und 46 zusammengestellt. In Ergänzung zu diesen Versuchen wurden auch die Titer in der passiven Hämagglutination gegen Murein-gebundenes Lipoprotein bestimmt. Diese Werte sind in Abb. 48 wiedergegeben. Als Kontrolle zu diesen Versuchen wurden jeweils parallel Kaninchen mit gleichkonzentrierten Suspensionen Hitze-abgetöteter (2 h, 100°) Bakterien immunisiert. Die erhaltenen Titer (T-Titer) sind in den Abb. 45, 46, 48 den Werten mit Essigsäure-degradierten Bakterien (T/HAc-Titer) gegenübergestellt.

Um eine allgemeinere Aussage machen zu können, wurden drei verschiedene R1-Mutanten und zwei verschiedene R4-Mutanten in die Versuche eingesetzt. In Abb. 47 sind die erhaltenen Endtiter nach Immunisierung mit den Hitze-abgetöteten und den Essigsäure-degradierten Bakterien einander gegenübergestellt.

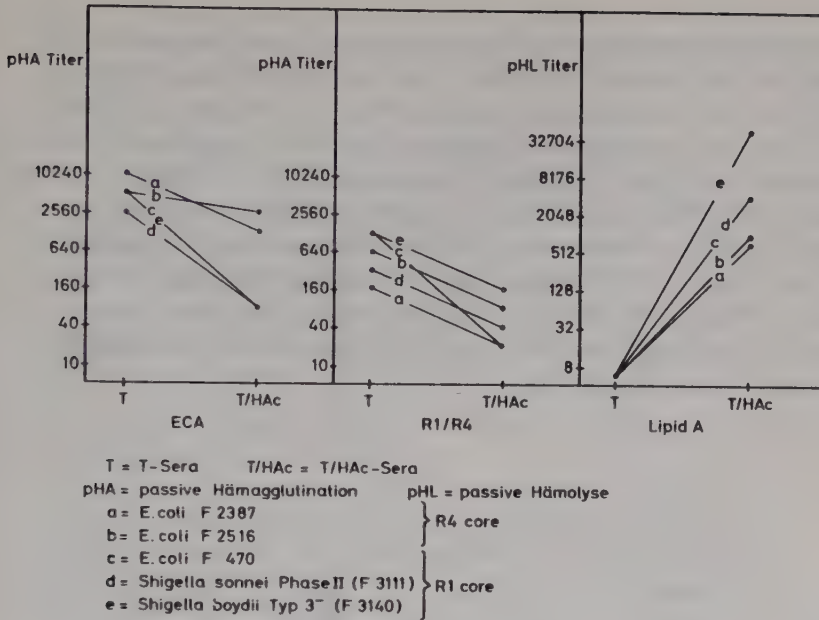


Abb. 47: Endtiter in der passiven Hämagglutination (pHA) gegen ECA, R-Antigene und in der passiven Hämolyse (pHL) gegen Lipid A in Seren nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten (T/HAc) und Hitze-abgetöteten Bakterien (T).

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl bei R1- als auch bei R4-Mutanten die ECA- und R-Immunogenität durch Essigsäure-Degradierung erniedrigt wird. Der Abfall der Titer gegen ECA- und R-Antigen geht ungefähr parallel.

Lipid A wird, wie erwartet (24), erst durch Essigsäure-Hydrolyse zum Immunogen und ist in nicht-hydrolysierten Bakterien vollständig kryptisch. Wo, wie im Fall der R4-Mutanten, ein geringerer Abfall der ECA- bzw. R-Immunogenität beobachtet wird, ist umgekehrt auch die Lipid A-Immunogenität relativ schwach ausgeprägt (s. a und b in Abb. 47). Diese Beobachtungen und Ergebnisse bestätigen auf anderem Wege die Resultate der [^{14}C]-GlcNAc-Experimente über die Bindung des immunogenen ECA an das Core-Oligosaccharid der R-Lipopolysaccharide. Haptenisches ECA ist relativ säurestabil und seine Antigenität wird durch 1%ige Essigsäure nicht beeinflusst.

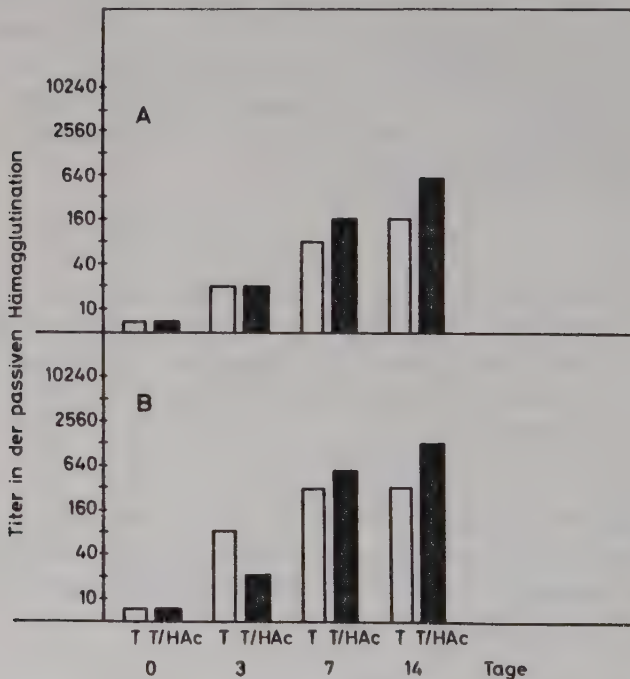


Abb. 48: Lipoprotein-Titer in der passiven Hämagglutination nach Immunisierung mit Essigsäure-degradierten (T/HAc) und Hitze-abgetöteten (T) Bakterien der Stämme *Shigella boydii* Typ 3⁻ (F 3140) (A) und *E. coli* (F2387) (B)

Die gegen (Murein-) Lipoprotein in der passiven Hämagglutination gemessenen Titer zeigen, daß Lipoprotein in R-Mutanten nur partiell kryptisch ist (s. Abb. 48). Die Stabilität des Lipoproteins gegen Hitze-Behandlung und Essigsäure-Hydrolyse ist bemerkenswert, wurde aber schon von Braun (10) beobachtet. Lipid A und Lipoprotein sind potente B-Zell-Mitogene. Beide Mitogene sind in Essigsäure-degradierten Bakterien intakt: Es besteht die Möglichkeit, degradierte Bakterien als hochmolekulare Träger für Immunisierungen mit relativ niedermolekularen Antigenen (ECA, Vi-Antigen, etc.) zu benutzen (77).

4.3. Zusammenfassung

Nach Essigsäure - Degradierung der zu Immunisierungen benutzten Bakteriensuspensionen sinken ECA- und R-Titer im Vergleich zu Werten, die mit Hitze-abgetöteten Bakterien erhalten wurden, stark ab. Ein hoher Lipid A-Titer wird erst durch die Degradierung erhalten, so daß Lipid A als völlig kryptisches Antigen bestätigt werden konnte. Lipoprotein ist in R-Mutanten nur partiell kryptisch, seine Immunogenität wird durch HAC-Hydrolyse der zur Immunisierung benutzten Bakteriensuspension (Titeranstieg 1-2 Stufen) erhöht.

Aus dem reziproken Verhalten der Immunogenität von ECA und R-Antigen einerseits und Lipid A andererseits kann geschlossen werden, daß ECA in ECA-immunogenen Stämmen am R-Core gebunden ist und mit dem R-Antigen durch Hydrolyse der Säure-labilen ketosidischen Bindung von KDO an Lipid A freigesetzt wird. Die Antigenität von haptischen ECA wird durch HAC-Hydrolyse nicht beeinflusst, so daß die beobachteten Immunogenitätsunterschiede nicht auf einer Zerstörung von ECA beruhen können.

C. Zusammenfassung und Diskussion

Die beschriebenen Untersuchungen mit Ferritin-konjugierten ECA-spezifischen Antikörpern ergaben, daß ECA in der äußeren Membran lokalisiert und dort für Antikörper zugänglich ist. Ein Vergleich der Ferritin-Markierung der beiden R-Mutanten F 470 und F 614 von E.coli O8:K27⁻ zeigt beim erstgenannten Keim eine viel dichtere Ferritin-Beladung als bei F 614. Dieser Stamm (F 470) besitzt das immunogene ECA, während der genetisch eng-verwandte Stamm F 614 nur haptenisches ECA hat. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Beobachtungen von Neter et al. (95) über die Mengen von ECA in ECA-immunogenen und ECA-nicht-immunogenen Stämmen, wie sie durch die Häm-agglutinationshemmungsreaktion bestimmt wurden (95). Der als negative Kontrolle vorgesehene Stamm F 1283 (ECA-negative rfe⁻-Mutante) zeigt nach der Inkubation mit Antikörper-Ferritin-Konjugaten nur in Membranfalten einige wenige Ferritin-Moleküle angelagert. Da er aber außerdem viele "blebs", d.h. Vesikel mit Material der äußeren Membran, an der Oberfläche besitzt, ist er als Negativ-Kontrolle nicht besonders geeignet. Allerdings sind die "blebs" durch ihre Größe deutlich von den Ferritinpartikeln unterscheidbar.

Bei ECA-haltigen Stämmen war kein Unterschied in der Ferritin-Beladung bei direkter und indirekter Methode zu erkennen, was darauf hinweist, daß ECA für ECA-Antikörper, - bei R-Mutanten zumindest - gut zugänglich ist.

Vergleichbare Untersuchungen an E.coli 014:K7 und der daraus isolierten rfe-Mutante F 1327 waren durch den Umstand erschwert, daß die äußere Membran durch Auflagerungen (evtl. durch das K7-Antigen) keine glatte Struktur zeigte, daß also angelagerte Ferritinpartikel nach der Beladung nicht gut auszumachen waren.

Nachdem die Markierungen mit Ferritin-Antikörper-Konjugaten eindeutig gezeigt hatten, daß ECA ein Bestandteil der äußeren Membran ist, war darüber hinaus von Interesse, ob dies die einzige Lokalisation in der Zelle darstellt. Für diese Fragestellung wurden Sphäroplasten und stabile Protoplasten L-Formen, die entweder nur reduzierte Mengen an Material der äußeren Membran (Sphäroplasten) oder überhaupt keine Zellwand (Protoplasten) besitzen, mit in die Untersuchungen eingeschlossen. Hitzeüberstände der entsprechenden Proteus mirabilis Wildtyp-Stämme als ECA-Quelle ergaben hohe Hämagglutinationstiter, während gleiche Mengen an Hitzeüberstand der Sphäroplasten-Suspensionen zwar eindeutig positive Erythrozyten-Sensibilisierung ergaben. Aber die gemessenen Titer waren sehr viel geringer. Überstände der Protoplasten als ECA-Quelle erwiesen sich in der passiven Hämagglutination, sowie deren Hemmung als auch in der Gelpräzipitation, als eindeutig negativ. Versuche mit Phenol/Wasser-Extraktion von Sphäroplasten und Protoplasten ergaben genau das gleiche Bild: Reduzierter ECA-Gehalt bei den Sphäroplasten; kein ECA in Protoplasten.

Diese serologischen Befunde werden durch die Ferritin-Antikörper-Markierungen unterstützt. Sowohl in Gefrierätz-Bildern, als auch in den Ultradünnschnitten waren bei den Sphäroplasten angelagerte Ferritin-Partikel auszumachen, die mit den Resten der äußeren Membran assoziiert waren, und die bei ausgelaufenen Zellen nur an der Außenseite der Zellen feststellbar waren. Bei Protoplasten waren mit beiden Techniken keine Ferritin-Anlagerungen feststellbar.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen stehen Befunde von Johnson und Domingue (47), die bei E. coli - nach Membran-Trennung - ECA sowohl in der äußeren als auch in der cytoplasmatischen Membran und selbst im Cytoplasma nachweisen konnten. Die Möglichkeit, daß ECA unter den Bedingungen der Membran-Darstellung (French press) aus der äußeren Membran freigesetzt wird und sich dann wegen der großen Oberflächenaktivität leicht an andere makromolekulare oder zelluläre Strukturen anlagert, wird auch von Johnson und Domingue (47) nicht ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß ECA ohne jegliche Vorbehandlung auf Erythrozyten, Lymphozyten, Fibroblasten etc. aufzieht und diesen Zellen passiv ECA-Spezifität verleiht. Geringe Mengen an ECA oder ECA-Vorstufen mögen im Cytoplasma synthetisiert und dann erst in die äußere Membran geschleust werden. Diese Mengen müssen aber äußerst gering sein, denn sonst müßte ECA in Phenol/Wasser-Extrakten der Protoplasten nachgewiesen werden können. Schon 1 µg gereinigtes ECA reicht aus, um 25 µl Erythrozyten-Sediment zu sensibilisieren und mit einem guten ECA-Antiserum einen Hämagglutinationstiter von 5 000 - 10 000 zu erhalten.

Über die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein anderer leicht durchzuführender Weg zur Demonstration von ECA in der äußeren Membran gewählt. Aoki et al. (3) hatten schon 1966 gezeigt, daß mit O14-Seren und anti-IgG-Fluoreszein-Konjugaten ECA bei Enterobacteriaceen nachweisbar ist. Diese Versuche wurden aber nicht mit mono-spezifischen Antiseren durchgeführt: die Spezifität war allein dadurch angezeigt, daß ECA-freie Nicht-Enterobacteriaceen keine Fluoreszenz zeigten. Durch die Verwendung ECA-spezifischer Seren konnte nun gezeigt werden, daß in der Tat ECA in der äußeren Membran mit dieser Technik in einfacher Weise nachweisbar ist. Aoki et al. (3) stellten luftgetrocknete Bakterien-Ausstriche auf Objektträgern her,

die dann mit fluoreszierenden Antikörpern überschichtet wurden. Diese Technik gab bei unseren Versuchen keine zufriedenstellenden Ergebnisse: deshalb wurde die Beladung der Bakterien mit fluoreszierenden Antikörpern, ähnlich wie bei der Ferritin-Markierung, in wässriger Lösung im Reagenzglas nach der indirekten Methode durchgeführt. Mit dieser "Sandwich-Technik" war es möglich, lebende Stämme mit immunogenem und solche mit haptenischem ECA durch ihre unterschiedliche Fluoreszenz-Intensität zu erkennen und zu differenzieren.

Bei der Beladung von Sphäroplasten mit fluoreszierenden Antikörpern wurde festgestellt, daß sich stärker fluoreszierende Teile, d.h. ECA-haltige Bezirke, relativ rasch über die Zelloberfläche hinwegbewegten, in Teile zerfielen und wieder zusammenschlossen. Dies kann so gedeutet werden, daß ECA nicht fest an einer Stelle fixiert ist, sondern im Rahmen der Fluidität der äußeren Membran (oder den Resten der äußeren Membran) frei beweglich ist. Dafür spricht auch die bei ECA-haltigen, aber nicht-immunogenen Stämmen beobachtete granuläre Verteilung der Fluoreszenz, die dem Phänomen des "Capping" entspricht.

Die Frage, wie ECA in der äußeren Membran verankert ist, ist noch nicht eindeutig beantwortet. Es könnte sein, daß ECA mit einem Protein assoziiert vorliegt. Dafür spricht die Beobachtung, daß ECA mit PCP nicht direkt aus der Bakterienzelle extrahiert werden kann, sondern daß erst mit Phenol/Wasser unter Protein-denaturierenden Bedingungen vorextrahiert werden muß. Kürzlich wurde von Dr.R.Geyer (25) ein weitverbreitetes Protein aus Salmonella minnesota R 595 extrahiert, das als k- (= komplexierendes) Protein bezeichnet wurde und dessen

isoelektrischer Punkt bei pH 10.3 liegt. Dieses stark basische Protein kann mit LPS komplexieren, wahrscheinlich indem sich ein Ladungskomplex zwischen der negativen Ladung im Core/Lipid A-Bereich des LPS und der positiven Nettoladung des Proteins ausbildet. ECA kann mit Lysozym, das einen ähnlichen p_K -Wert wie das k-Protein hat, aus Lösungen ausgefällt werden, wie Marx und Petcovici (80) kürzlich zeigten. Das k-Protein könnte ebenso mit dem stark negativ geladenen ECA einen Ladungskomplex bilden. Nach neuesten Untersuchungen (126,127) wurde ein anodisch wanderndes thermolabiles Antigen (ATA) bei verschiedenen gram-negativen Bakterien nachgewiesen (107), das in der äußeren Membran vorkommt und mit Detergentien leicht von der Zellwand ablösbar ist (108,109). Weitere Untersuchungsergebnisse sprechen dafür (140), daß ATA an der Lipiddoppelschicht der äußeren Membran lokalisiert, aber nicht kovalent gebunden ist. Es könnte also mit LPS und/oder ECA über bivalente Metallionen Assoziationen eingehen und so die Verankerung des ECA in der äußeren Membran mitbestimmen. Beladungsversuche mit Ferritin-markierten ATA-Antikörpern (140) waren nur bei R-Mutanten erfolgreich und zeigten, wie bei der Markierung mit ECA-Antikörpern, eine fokale Verteilung der Ferritinpartikel über die ganze Oberfläche.

ECA hat einen geringen Fettsäuregehalt (Palmitinsäure). Wenn diese Fettsäure Teil einer distalen kleinen Lipid-Komponente ist, dann könnte ECA direkt in die Lipidschicht der äußeren Membran integriert sein, ebenso wie Lipoteichonsäure bei gram-positiven Bakterien. Untersuchungen über die Chemie des Lipid-Teils des ECA sind im Gange.

Die Beobachtung, daß die ECA-Immunogenität nur bei E.coli R-Mutanten vom R1- und R4-Core-Typ auftritt und nur dann, wenn das O-Translocase-System (rfaL-Genort) intakt ist und komplette R-Cores vorliegen, hatte bereits früher zur Annahme geführt, daß ECA bei ECA-immunogenen Stämmen kovalent am R-Core gebunden ist. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde versucht, die charakteristischen ECA-Komponenten GlcNAc und ManNAcUA nach Markierung mit [^{14}C] als Bestandteil der R-Core-Fraktionen zu identifizieren. Nach Isolierung von LPS durch das PCP-Verfahren, bei dem haptenisches ECA nicht extrahierbar ist, wurde LPS durch Essigsäure (HAc) gespalten und die Oligosaccharid-Fraktionen über DEAE-Cellulose getrennt. Durch serologische Techniken (Hemmung der passiven Hämagglutination, Immunpräzipitation) wurde gefunden, daß die sauerste Fraktion (III) ECA-Aktivität aufwies. Nur in Hydrolysaten dieser Fraktion waren die charakteristischen Aminosucker-Komponenten des ECA nachweisbar. Die vergleichbaren Fraktionen III der beiden Mutanten F 614 (mit ECA-Hapten) und F 1283 (ECA-negative Mutante) enthielten weder diese markierten Aminosucker, noch zeigten sie Reaktion in ECA-hämagglutinierenden Systemen.

Die Bindung des ECA an den R-Core macht ECA zum potenten Immunogen. Die Übertragung von Haptenen der Bakterienzelle auf den R-Core, wo O-spezifische Ketten zum Teil durch andere Zuckerketten ersetzt werden können, scheint ein nicht zu seltenes Ereignis zu sein. Beispiele von solchen übertragbaren Haptenen stellen die T1- und T2-Antigene von Salmonella und die sauren Polysaccharide von E.coli Serotypen dar. Wie für die ECA-Immunogenität ist auch für die T1-Immunogenität das Translocase-System (rfaL-Gen) von Bedeutung.

Die Detailstrukturen der R1- und R4-Core-Typen sind bekannt (Abb. 9) und zeigen eine identische Zuckerkette, die bei R1 durch Glucose und bei R4 durch Galaktose substituiert ist.

Es ist daher anzunehmen, daß ECA an dem gemeinsamen Teilstück der R-Core-Strukturen fixiert ist. Leider waren Versuche, die genaue Position der Verknüpfung von ECA durch vergleichende Methylierungsanalysen zu bestimmen, nicht erfolgreich, weil die Trennung von substituierten und unsubstituierten Core-Stümpfen an DEAE-Cellulose nur sehr unvollständig ist.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Befunden von Hammarström et al. (31) mit E.coli O14, obwohl die von diesen Autoren gezogenen Schlußfolgerungen ganz andere sind. Sie benutzten E.coli O14-LPS aus der Wasserphase eines Phenol/Wasser-Aufschlusses für die Degradierung mit Essigsäure. Nach Alkali-Behandlung wurde das Material an einer Sephadex G-50 Säule fraktioniert. Ein Hauptpeak mit R-Core-Zuckern war aktiv in der Hemmung eines ECA-Hämagglutinations-Systems. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß bei E.coli O14 R- und ECA-Spezifität assoziiert bzw. identisch sind. Dem steht entgegen, daß ECA-freie R1-Mutanten existieren und daß Absorptionen mit diesen Mutanten den ECA-Titer der Seren nicht erniedrigt. ECA und R1-Spezifität sind demzufolge unverwandte serologische Spezifitäten.

Wenn immunogenes ECA am R-Core gebunden ist, und wenn durch Essigsäure-Hydrolyse die ketosidische Bindung von KDO an Lipid A relativ leicht spaltbar ist, sollte die ECA-Immunogenität in annähernd der gleichen Weise durch Essigsäure-Hydrolyse verloren gehen, wie die spezifische R-Immunogenität. Die mit R1- und R4-Core-haltigen ECA-immunogenen Stämme vor und nach der HAc-Hydrolyse durchgeführten Immunisierungen zeigten genau dieses Ergebnis: Paralleles Absinken von ECA- und R-Immunogenität und - in reziproker Weise - ansteigende Lipid A-Immunogenität. Bei R4-Core-Stämmen scheint aus bisher nicht geklärten Gründen die Bindung R-Core/Lipid A etwas säurestabiler zu sein. Es wurde ein geringerer Abfall der ECA- und R4-Immunogenität und ebenso ein geringerer Anstieg der Lipid A-Immunogenität beobachtet. Lipid A ist in den R-Mutanten völlig

kryptisch, im Gegensatz zu Lipoprotein, was auch bei Hitze-behandelten Stämmen schon eine bedeutende Antikörper-Antwort gibt. Die Immunogenität von Lipoprotein steigt aber nochmals um 1 - 2 Titerstufen nach Essigsäure-Behandlung an. Dies zeigt, daß auch Lipoprotein bei R-Mutanten ein partiell kryptisches Antigen der äußeren Membran darstellt.

Die hier vorgelegten Untersuchungen haben zwei Hauptergebnisse gebracht: Es konnte gezeigt werden, daß ECA bei immunogenen und nicht-immunogenen Stämmen nahezu ausschließlich in der äußeren Membran der Bakterien lokalisiert und zumindest bei R-Mutanten für ECA-Antikörper leicht zugänglich ist. Bei immunogenen Stämmen ist ECA kovalent an den R1- bzw. R4-Core gebunden und die Immunogenität ist dadurch - trotz der Säurestabilität der ECA-Antigenität - schon durch Erhitzen mit 1%iger Essigsäure zu zerstören.

Mannosaminuronsäure wurde als seltene Komponente des ECA erkannt und im K7-Antigen von E.coli (43,81), im K56-Antigen von E.coli (21), in Lipoteichonsäuren gram-positiver Bakterien (33,34,103) und in einem Oberflächenantigen von T-Mutanten von Staphylococcus aureus (152) gefunden. Deshalb reicht es nicht aus, radioaktiv markierte Mannosaminuronsäure als alleinigen spezifischen Nachweis für die Anwesenheit von ECA zu werten. Serologische Methoden sind zusätzlich für den ECA-Nachweis erforderlich. Durch die Kombination dieser beiden Untersuchungsmethoden konnte jedoch gesichert werden, daß ECA am LPS-Core kovalent gebunden ist. Die Anwesenheit von ECA kann für taxonomische Fragen eine entscheidende Rolle spielen. So fand die kürzlich erfolgte Auftrennung des früheren Genus Pasteurella in Yersinia (pestis, pseudotuberculosis, enterocolitica) und in Pasteurella (multocida, haemolytica)- wobei nur die Yersinien in die Familie der Enterobacteriaceen eingegliedert wurden - eine wertvolle Stütze durch die ECA-Analyse. ECA wurde nur bei den Yersinia-Stämmen, nicht aber bei den Pasteurella-Spezies gefunden (4,62,73,74). Auch unter der Bakterienart Erwinia chrysanthemi (62) wurden sechs ECA-negative Stämme gefunden, die eine andere taxonomische Einordnung dieser Spezies

veranlassen könnten. ECA hat auch Bedeutung für die Virulenz von Bakterien. Es ist erwiesen, daß ECA-negative Mutanten von Salmonella typhimurium um den Faktor 10 weniger virulent für Mäuse sind als genetisch nahestehende ECA-haltige Stämme (138).

Es wurden serologische Kreuzreaktionen zwischen ECA und Oberflächenantigenen des Dickdarm-Epithels von Mensch, Ratte und Maus festgestellt. Die Antikörper wurden aus Seren von Patienten isoliert, die an ulcerativer Colitis, bzw. an Morbus Crohn erkrankt waren. Wegen dieser beobachteten Kreuzreaktionen wurde vermutet, daß durch ECA Autoimmunerkrankungen dadurch verursacht werden, daß die bestehende Toleranz gegen Colon-Gewebe durch das kreuzreagierende ECA durchbrochen wird (61,104). Für Morbus Crohn ist allerdings inzwischen ein Virus als Krankheitsursache ermittelt worden (26).

Die Hoffnung, ECA als mögliches Agens für eine prophylaktische Vakzination einzusetzen, hat sich bis heute nicht erfüllt. Nur gegen experimentelle Pyelonephritis in Kaninchen konnte durch vorhergehende Immunisierung mit ECA ein Schutz erreicht werden (14). Es wurde deshalb untersucht, wie die Kinetik der Antikörperbildung gegen ECA im Kaninchen verläuft. Im Gegensatz zu anderen Antigenen wurden gegen ECA überwiegend IgM-Antikörper induziert. Es bedeutet, daß ein möglicher Immunisierungsschutz nur kurzfristig anhält, da IgM-Antikörper schneller als IgG-Antikörper aus dem Serum verschwinden.

Für diagnostische Zwecke ist der ECA-Antikörper-Nachweis von Bedeutung (chronische Harnwegsinfektion, eitrige Peritonitis, Shigellose). Begonnene Untersuchungen mittels der ELISA-Technik anti-ECA-IgG und -IgM in Patientenseren zu quantifizieren, führten bisher jedoch noch nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen.

E. MATERIAL UND METHODEN

1. Nährmedien

A 3 Medium

Antibiotic Medium 3 (Difco, 0243-01)
für Agarplatten: 15 g / 1 Bacto-Agar (Difco)

Standardbouillon

Standard I Medium (E. Merck AG, Darmstadt)

CH-Medium

Caseinpepton (Brunnengräber)	15 g
Hefeextrakt (Difco)	5 g
NaCl (E.Merck)	3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (E.Merck)	2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (E.Merck)	0.2 g
Glucose (E.Merck)	4 g

In destilliertem Wasser lösen, pH 7.2 mit NaOH einstellen,
auf 1 Liter auffüllen, 30 min. bei 120° autoklavieren.

2. Puffer

Isotonische Kochsalzlösung

NaCl (E. Merck) 8.5 g

In 1 Liter destilliertem Wasser lösen.

PBS (phosphate buffered saline) - Puffer

NaCl (E.Merck)	72 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (E.Merck)	12.46 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (E.Merck)	2.76 g
NaN ₃ (Baker)	1.8 g

In 9 Liter destilliertem Wasser lösen.

VBS-Puffer pH 7.1; (55)

Stammlösung:

Na-Acetat x 3 H ₂ O (E. Merck)	1.943 g
Na-Diäthylbarbitursäure (Veronal) (E.Merck)	2.943 g
NaCl	3.4 g
H ₂ O bidest.	ad 100.0 ml

Aqua bidest. vor Gebrauch aufkochen und auf 20° abkühlen lassen. Substanzen nacheinander in einem bis zur Hälfte mit H₂O gefüllten Meßkolben in Lösung bringen, dann auf 100 ml auffüllen.

Stammlösung	10.0 ml
0.1 N HCl	14.0 ml
H ₂ O bidest.	26.0 ml
1 M CaCl ₂	0.5 ml

mit NaOH auf pH 7.1 einstellen.

VBS-Puffer pH 7.3; (24)

NaCl (Serva)	42.5	
Na-Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	1.875 g	
lösen in H ₂ O	700.0	ml
+ Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	2.875 g	
gelöst in heißem H ₂ O	250.0	ml
+ 1 M MgCl ₂	2.5	ml
0.3 M CaCl ₂	2.5	ml
H ₂ O dest.	ad	1 1

zum Gebrauch 1 : 5 verdünnen und pH auf 7.3 einstellen.

VBS-Puffer pH 7.5; (49)

NaCl (Serva)	42.5	g
Na-Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	1.875 g	
lösen in H ₂ O	700.0	ml
+ Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	2.875 g	
gelöst in heißem H ₂ O	250.0	ml
Aqua dest.	ad	1 1

zum Gebrauch auf 1 : 5 verdünnen und auf pH 7.5 einstellen.

Borat-Puffer (139)

Natriumtetraborat (Serva)	0.01 M
NaCl (Serva)	0.3 M
pH 7.5	

Hirschfeld-Puffer für Gelplatten; (40)

Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	1.66 g
Natrium-Diäthylbarbiturat (E.Merck)	10.51 g
unter Erwärmen in ca. 500 ml H ₂ O auflösen	
Calcium-Lactat (E.Merck)	1.54 g
NaN ₃ (Baker)	0.2 g
auf 1 Liter auffüllen (pH = 8.6 - 8.7)	

Hirschfeld-Puffer für Elektrodenkammer ; (40)

Diäthylbarbitursäure (E.Merck)	2.76 g
Natrium-Diäthylbarbiturat (E.Merck)	17.52 g
unter Erwärmen in ca. 500 ml H ₂ O lösen	
Calcium-Lactat (E.Merck)	0.77 g
NaN ₃ (Baker)	0.4 g
auf 2 Liter auffüllen (pH = 8.6 - 8.7)	

Hämagglutinations-Puffer; (94)

0.9 % NaCl	100.00 ml
0.15 M KH ₂ PO ₄	23.9 ml
0.15 M Na ₂ HPO ₄	76.00 ml
pH 7.2	

Porath-Puffer; (105)

Tris (Serva)	48.4 g
Glycin (Serva)	75.1 g
H ₂ O	1.5 l
Butanol -1 -01 (E.Merck)	40.0 ml

mit HCl auf pH 7.6 einstellen und
ad 2 l mit H₂O auffüllen

3. Bakterien

3.1. Stämme

In Tabelle 15 sind die verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Stämme, die immunogenes ECA enthalten, werden mit ECA^{imm.} bezeichnet. Sie bewirken im Kaninchen Antikörperbildung, während die mit ECA⁺ bezeichneten Stämme ECA enthalten, aber nach Immunisierung keine Antikörper im Kaninchen hervorrufen. Aus ECA⁻ (negativen) Mutanten kann kein ECA isoliert werden.

Stamm-Nr.	Spezies	LPS-Typ	ECA-Form	Herkunft
F 470	<u>E.coli</u> 08 ⁻ :K27 ⁻	R	imm.	Instituts-Sammlung (G.Schmidt)
F 614	"	R	+	"
F 1283	"	R	-	"
F 2387	<u>E.coli</u> 014:K7		imm.	E. Neter, Buffalo
F 2516	<u>E.coli</u> 014:K7 ⁻	R	imm.	Instituts-Sammlung (G. Schmidt)
F 1327	"		-	"
F 3140	<u>Shig.boydii</u> Typ 3 ⁻		imm.	"
F 3111	<u>Shig.sonnei</u> Phase II		imm.	"
F 1756	<u>Sal.monteideo</u> SH 94	S	+	P.H. Mäkelä, Helsinki
	<u>E. coli</u> K-12 D21e8	Re	+	H.G. Bormann, Umeå
	<u>Prot.mirabilis</u> D 52		+	H. Martin, Darmstadt
	<u>Prot.mirabilis</u> VI		+	"
	<u>Prot.mirabilis</u> 19		+	"
	<u>Prot.mirabilis</u> UL 19		+	"
	<u>Prot.mirabilis</u> LD 52		-	"

Tabelle 15: Zusammenstellung aller verwendeten Bakterien

3.2. Kultivierung

Je nach Mengenbedarf wurden die Bakterien nach dem Batch-Verfahren in Laborfermentern gezüchtet (115). Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Bakterien durch Phenolzugabe abgetötet, abzentrifugiert, mit 0.85%iger NaCl-Lösung gewaschen und bei -18° eingefroren.

Für kleineren Mengenbedarf wurden die Bakterien in 100 ml Standardbouillon über Nacht bei 37° angezüchtet und anschließend in 1 l A3-Medium überimpft. Nach etwa 2 - 4 Stunden Wachstum bei 37° wurden die Bakterien entweder mit Phenol abgetötet oder blieben für die folgende Zentrifugation und Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung am Leben. Für die Serumabsorptionen wurde der Bakterienbewuchs von großen Petrischalen (Durchmesser 14 cm) nach 24-stündigem Wachstum bei 37° mit 0.85%iger NaCl abgeschwemmt, eine Stunde lang auf 100° erhitzt und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

In kleinen Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm wuchsen die Bakterien für die Immunisierungen. Sie wurden ebenfalls mit Kochsalzlösung abgeschwemmt und gewaschen.

3.3. In vivo-Markierung mit N-Acetyl-[1-¹⁴C]-D-glucosamin; (57)

Radioaktives N-Acetyl-D-glucosamin wurde von Amersham & Buchler, Braunschweig, bezogen.

Als Vorkultur wurden in 100 ml A3-Medium mit 0.1% Glucosezusatz Bakterien 12 Stunden lang bei 37° unter mäßigem Schütteln (Schüttler, Infors AG, Basel) gezüchtet. Die gesamte Vorkultur wurde zur Hauptkultur gegeben. Die Hauptkultur bestand aus 1 Liter A3-Medium mit 0.5% Glucosezusatz und 50 µCi N-Acetyl-[1-¹⁴C]-D-glucosamin. Bei 37° wurde die Hauptkultur in einem Gyrotory-Shaker (Model G25, New-Brunswick-Scientific-Company, New Brunswick, N.J., USA) geschüttelt. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Bakterien abzentrifugiert, gewaschen und lyophilisiert (57).

3.4. Wachstumsmessung

Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurde die optische Dichte einer aliquoten Menge der Hauptkultur in Abständen von 30 min. bei 600 nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ III (Zeiss, Oberkochen) gemessen. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Bakterien bei 800 x g abzentrifugiert (Sorvall RC-2, Kühlzentrifuge) zweimal mit 0.8%iger NaCl-Lösung gewaschen und lyophilisiert.

4. Extraktionsmethoden

4.1. Phenol/Wasser-Extraktion

Gefriergetrocknete Bakterien wurden bei 68° mit einem Phenol/Wasser-Gemisch (1:1/v:v) nach der Methode von Westphal et al. (144) extrahiert.

4.2. PCP-Verfahren

Lipopolysaccharide von gefriergetrockneten R-Mutanten wurden nach dem Phenol/Chloroform/Petroläther-Verfahren (2:5:8 / v:v:v) nach Galanos et al. (23) isoliert.

4.3. Kombination

Die wässrige Phase der Phenol/Wasser-Extraktion wurde nach Dialyse und Lyophilisation in der PCP-Mischung aufgenommen und nach 4.2 aufgearbeitet.

5. Analytische Methoden

5.1. Hydrolyse-Bedingungen

Zur Gewinnung der R-Oligosaccharide wurden jeweils 100 mg der isolierten Lipopolysaccharide mit 10 ml 1%iger Essigsäure versetzt. Um eine optimale Spaltung der ketosidischen Bindung des KDO zum Lipid A zu erreichen, wurde die Hydrolyse unter ständiger Bewegung bei 100° 1.5 Stunden lang

durchgeführt. Freigesetztes Lipid A wurde nach Waschen mit destilliertem Wasser und anschließender Zentrifugation bei 4000 x g 30 min. lang entfernt. Der Überstand mit degradiertem Polysaccharid wurde lyophilisiert (66).

Zur Freisetzung von Aminosackern wurden parallel gleiche Mengen an degradiertem Polysaccharid (5 mg) in 1 ml 4 N HCl aufgenommen und in zugeschmolzenen Gläschen 2 Stunden bei 100° hydrolysiert. Danach wurde im Vakuum über P₂O₅ und KOH-Plättchen HCl entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und direkt in die Hochspannungs-Papier-elektrophorese eingesetzt (76).

5.2. Hochspannungs-Papierelektrophorese; (56)

Papier:	Schleicher & Schüll; 2043a (15 x 70 cm)
Spannung:	3000 V (45 V/cm)
Stromstärke:	50 - 180 mA
Temperatur:	10 - 20°
Laufzeit:	60 - 120 Minuten
Puffer:	Pyridin/Ameisensäure/Essigsäure/Wasser (1:1.5:10:90 / v:v:v:v) pH 2.8
Kühlung:	Esso-Varsol (n-Heptan) über einen Kälte- thermostaten

20 µl der zu untersuchenden Proben und Vergleichssubstanzen wurden mit einer Konstriktionspipette im Abstand von etwa 1 cm zueinander aufgetragen und dann das Papier gleichmäßig mit Puffer angefeuchtet. Anschließend wurde es so in die Elektrophorese-Kammer eingehängt, daß die Enden in die Elektrolytkammern eintauchten. Nach dem Lauf wurde das Elektrophogramm im Trockenschrank bei 70° getrocknet und angefärbt.

5.3. Anfärbungen

Trevelyan; (136)

- Färbelösungen: (a) 1 ml gesättigte, wässrige AgNO_3 -Lösung in 200 ml Aceton
- (b) 25 ml 40% wässrige NaOH in 225 ml Äthanol
- (c) 5 % wässrige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung

Das getrocknete Papierchromatogramm wurde in Lösung (a) eingetaucht und luftgetrocknet. Anschließend wurde es durch die Farblösung (b) gezogen und dann im geöffneten Trockenschrank in der Warmluft getrocknet, bis die gewünschte Intensität der Farbflecken eingetreten war. Zum Schluß wurde es in Lösung (c) fixiert, gründlich gewaschen und getrocknet.

Ninhydrin

- (a) 0.25%ige Lösung von Ninhydrin in Aceton
- (b) gesättigte wässrige Lösung von $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

Getrocknete Chromatogramme wurden durch Lösung (a) gezogen und 5 - 10 Minuten bei 100° im Trockenschrank getrocknet. Zur Fixierung der Ninhydrinfärbung können die Chromatogramme durch Lösung (b) gezogen und getrocknet werden.

5.4. Radiochromatogramm

Die Radioaktivität auf den Papier-Elektropherogrammen wurden in einem Packard-Radiochromatogramm-Scanner (Model 7201) gemessen. Dazu wurden die Chromatogramme in etwa 2 cm breite Streifen geschnitten. Die gemessene Radioaktivität wurde mittels eines Schreibers (Packard recording ratender, Model 385) aufgezeichnet. Die Empfindlichkeit des Scanners wurde auf $E = 3 \times 10^5$ eingestellt.

5.5. Radioaktivitätsmessung

Szintillationslösung; (2)

Triton X 114 (Roth)	250 ml
2.5-Diphenyloxyzol (PPO) (Roth)	3 g
Aqua dest.	50 ml
Xylol (Roth)	ad 1 l

100 µl der radioaktiven Proben wurden zu 10 ml der Szintillationsflüssigkeit gegeben und so lange geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand. Die Proben in Szintillationsgläsern von Packard wurden in einem Flüssigkeits-szintillationsspektrometer (Packard Tri-Carb 2450) gemessen. "Quenching"-Effekte und die sich daraus ergebende Effektivität des Spektrometers wurden mit der "Channel-ratio"-Methode bestimmt (102). Das Spektrometer hatte eine Effektivität von 70 - 80 %.

6. Serologische Methoden

6.1. Immunisierungen

Für alle Immunisierungsversuche wurden Weiße Neuseeländer Kaninchen eingesetzt, die älter als 12 Wochen waren. Alle Immunisierungen wurden mit jeweils zwei Kaninchen durchgeführt: die Antigene wurden i.v. in die Ohrvene injiziert. Am ersten Tag erhielten sie 0.25 ml Bakteriensuspension (10^{10} Bakterienzellen/ml) in physiologischer Kochsalzlösung, am 4. Tag 0.5 ml und am 10. Tag 1.0 ml. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. Blutproben während der Immunisierung wurden vor den jeweiligen Injektionen durch Anritzen der Ohrvenen entnommen.

Während der dreimonatigen Immunisierung erhielten die Kaninchen an den Tagen 0, 15 und 78 jeweils 1 ml Bakteriensuspension (10^{10} Zellen/ml). An den Tagen 0, 7, 14, 20, 76, 83, 85 und 88 wurden ihnen 10-12 ml Venenblut entnommen.

6.2. Serumherstellung

Das gewonnene Blut wurde 1 Stunde bei 37° gehalten. Dann wurde zur vollständigen Gerinnung der Blutkuchen mit einem Kreuzschnitt geteilt, von der Gefäßwand gelöst und über Nacht bei 4° aufbewahrt. Das Serum wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 5000 U/min. 15 min. lang von dem Blutplasma getrennt. Zur Komplement-Zerstörung wurde es 30 min. lang auf 56° erwärmt. Gelagert wurde es bei -20°.

6.3. Serumabsorption

3 ml Antiserum wurden zur Absorption 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit dem Bakterienbewuchs von drei großen Petrischalen (Durchmesser 14 cm) zusammengegeben. Die Bakterien waren mit 0.85%iger NaCl abgeschwemmt, 1 Stunde auf 100° erhitzt, gewaschen und bei 10 000 - 12 000 x g abzentrifugiert worden. Sie blieben mit dem verdünnten Antiserum für drei Stunden bei 37° und anschließend für 24 Stunden bei 4° zusammen. Durch Abzentrifugieren der Zellen bei 12 000 x g wurde das Serum wiedergewonnen.

6.4. Serumchromatographie über Sephadex G 200 ; (137)

Serumprobe:	2 ml bis maximal 6 ml Vollserum
Säule:	100 x 2.7 cm Ø (Pharmacia, Freiburg)
Elutionsgeschwindigkeit:	10 ml/h (Perpex Pumpe, LKB, Stockholm)
Volumina der Fraktionen:	3 ml (Ultracrac 7000, LKB, Stockholm)
Proteindetektion:	Transmissionsmessung bei 280 nm (Uvicord II, 8300, LKB, Stockholm)
Registrierung:	2-Kanal-Punktschreiber 6520-4, (LKB)
Elutionspuffer:	Porath-Puffer

Die IgM- und IgG-Fraktionen wurden gesammelt und 72-100 Stunden lang gegen PBS mit mehrmaligem Wechsel des Außenmediums dialysiert. Durch Unterdruck-Dialyse wurden die Fraktionen eingengt und möglichst auf das ursprüngliche Serumvolumen gebracht.

6.5. Alkalisierung von Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (10 mg) wurde in 1 ml H₂O gelöst und mit 1 ml 0.25 M NaOH versetzt. Nach einstündiger Erhitzung auf 56° wurden ungelöste Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand mit Eisessig auf pH 5 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand 24 Stunden gegen Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das alkalisierte LPS in Wasser aufgenommen und als 0.1%ige Antigenlösung in der passiven Hämagglutination eingesetzt.

6.6. Passive Hämagglutination; (94)

50 µl Hämagglutinationspuffer wurden in jedes Loch einer Cook-Microtiterplatte eingefüllt. Mit 50 µl eines 1:10 verdünnten Antiserums wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt, so daß in jedem Loch der Titerplatte 50 µl Antiserumverdünnung vorlagen. Dazu kamen 50 µl mit Antigen beladene humane Erythrozyten der Blutgruppe A hinzu.

Nach Inkubation von einer Stunde bei 37° und anschließend 3 Stunden bei Zimmertemperatur wird der Hämagglutinationstiter als die reziproke Verdünnung abgelesen, bei der gerade noch komplette Hämagglutination erkennbar war. Parallel wurden als negative Kontrolle 50 µl Puffer mit 50 µl Antigen-beladenen Erythrozyten mitinkubiert. Zur Antigenbeladung wurden 25 µl 3 x gewaschener Erythrozyten mit 5 ml 0.85%iger NaCl verdünnt und mit entweder 100 µl 0.1 % alkalisiertem LPS 1 Stunde oder 50 µl 0.1 % ECA 30 min. bei 37° inkubiert. Um überschüssiges Antigen zu entfernen, wurden die beladenen Erythrozyten 3 x mit 0.85% Kochsalzlösung gewaschen.

6.7. Hämagglutinationshemmtest ; (146)

25 µl 1:50 verdünntes Kaninchen-Normalserum wurden in jedes Loch einer Cook-Microtiterplatte pipettiert, um ein gutes Zusammenfließen der Erythrozyten zu erreichen. Mit 25 µl einer 0.25 %igen Hemmstofflösung in physiologischer NaCl wird dann eine serielle Verdünnungsreihe durchgeführt. Die Antiserumverdünnung, von der jeweils 25 µl zu den bereits vorgelegten Proben in der Titerplatte hinzugegeben wurden, lag 2 - 3 Titerstufen unter den mit gleichem Antigen und Antiserum vorher in der passiven Hämagglutination bestimmten Maximaltiter. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37° werden 50 µl wie für die Hämagglutination sensibilisierte Erythrozyten hinzugegeben. Der Hämagglutinationshemmtiter wird dann nach einer Stunde Inkubation bei 37° abgelesen als die Konzentration, bei der die Hämagglutination gerade noch vollständig gehemmt wird.

6.8. Passive Hämolyse ; (24)

0.2 ml Schafererythrozyten-Sediment, das mit PBS 3 x gewaschen worden war, wurde in 4 ml PBS aufgenommen und 0.2 ml Lipid A-Lösung (2 mg/ml) wurden unter ständigem Rühren der Erythrozyten-Lösung zugesetzt und 30 min. bei 37° im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Sediment 3 x mit je 5 ml PBS gewaschen, in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 40 ml Veronal-Puffer aufgenommen.

1 ml Lipid A-Antiserum wurde vor Gebrauch mit 0.1 ml Schafererythrozyten-Sediment bei 30 min. im Eisbad absorbiert. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurde das überstehende Serum in den Hämolyse-Test eingesetzt.

Als Komplementquelle diente Meerschweinchen-Serum, das vorher genauso wie das Lipid A-Antiserum mit Schafererythrozyten absorbiert wurde. Zum Gebrauch wurde das Meerschweinchen-serum 1:10 mit Veronal-Puffer (pH 7.3) verdünnt.

In Mikrotiterplatten wurden jeweils 50 µl des zu testenden Antiserums seriell mit 50 µl VBS-Puffer (pH 7.3) verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe kommen 50 µl Lipid A-beladene Schafererythrozyten und 25 µl Komplementserum hinzu. Nach vorsichtiger Durchmischung der Titerplatten wurde diese 60 min. bei 37° inkubiert. Die Titerablesung erfolgte nach über 12 Stunden Stehen der Platten im Kühlschrank bei 4°.

6.9. IgM-Antikörper-Inaktivierung ; (98)

Gleiche Volumina des Testserums und einer 0.01 M Dithiothreitol-Lösung (Roth) in PBS mit pH 7.4 wurden zusammen gegeben und bei 37° eine halbe Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben unverändert als endgültige Serumverdünnungen weiter eingesetzt.

6.10. Immunpräzipitation; (40)

Agarose-Lösung

0.9 g Agarose (Serva, reinst)
+ 60.0 ml H₂O

unter Erhitzen lösen

+ 30.0 ml Hirschfeldpuffer

Die erwärmte Agaroselösung wurde auf entfettete Objektträger aufgetragen. Etwa 12 ml reichten für 3 Objektträger aus. Nach Erstarren des Gels wurde eine in der Mitte der Objektträger verlaufende Rinne und am einen Ende dieser im selben Abstand zu beiden Seiten zwei Löcher ausgestanzt. Die gestanzten Löcher wurden ausgehoben und mit 5 - 7 µl Antigenlösung angefüllt. Elektrophoretische Auftrennung des Antigen erfolgte in Immunelektrophoresekammern (LKB, Stockholm) bei einer Spannung von 260 V (Feldstärke 10 V/cm) in einer Zeit von 60 Minuten. Danach wurde die vorgestanzte Rinne ausgehoben und mit Antiserum ausgefüllt. Nach 2-3 Tagen Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4° wurden die Präzipitationslinien zeichnerisch dokumentiert.

7. Markierungsmethoden

7.1. Proteinbestimmung mit Biuret; (142)

50 µl Eiweißlösung wurden auf 1 ml 0.85% Kochsalzlösung aufgefüllt und mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt. Die Extinktion dieser Lösung wurde bei 540 nm gemessen. Die

Multiplikation des Extinktionswertes mit dem Biuret-Koeffizienten, der mit einer vorher erstellten Eichkurve ermittelt wurde, ergab den Eiweißgehalt in Prozent. Bei Proteinlösungen mit Tris-Beimengungen war eine TCA-Fällung erforderlich. Dazu wurden 50 μ l Proteinlösung in 0.5 ml wässriger 20%iger Trichloressigsäure für 10 min. bei 4° aufgenommen. Nach 10 min. Zentrifugation bei 4000 U/min. wurde das Sediment mit 0.5 ml 0.5 N NaOH und 0.5 ml H₂O und 1 ml Biuret-Reagenz versetzt und nach 30 min. dessen Extinktion bei 540 nm gemessen. Als Leerproben wurden jeweils 1 ml NaCl und 1 ml Biuret-Reagenz mitgemessen. Für die durchgeführten Messungen betrug der Biuret-Koeffizient 14.5.

7.2. Kupplung von Ferritin und Antikörpern; (90,139)

Reagenzien

VBS-Puffer pH 7.1

Borat-Puffer

Ferritin (Serva, reinst)

Glutardialdehyd (25%ig in H₂O, Roth)

Aktivkohle

Ionenaustauscher (Dowex 1 x 8, OH⁻-Form)

100 mg Ferritin wurden in 10 ml VBS-Puffer gelöst und 10 min. bei 20 000 x g (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 2 Stunden bei 100 000 x g (Beckmann-Zentrifuge, L5-75) zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1 ml VBS aufgenommen.

Für jeden Versuch wurde eine 10%ige Glutardialdehyd-Lösung in destilliertem Wasser frisch angesetzt. Die Lösung wurde

dann über Aktivkohle gereinigt und mit Ionenaustauscher Dowex auf pH 6.5 - 7.0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit VBS 1:10 verdünnt.

IgG-Antikörper und vorbereitetes Ferritin wurden im Gewichtsverhältnis 1:1 in VBS-Puffer (pH 7.1) zusammengegeben, so daß die Konzentration an Protein 30-40 mg/ml in einem Maximalvolumen von 3-4 ml betrug.

Dieser Ansatz wurde mehrere Tage gegen Borat-Puffer bei 4° unter mehrmaligem Wechsel des Außenmediums dialysiert. Jeweils 50 µl des IgG-Ferritin-Gemisches wurden mit 1,2,3, 4 und 5 µl Glutardialdehyd-Lösung versetzt, um die geeignete Menge an Glutardialdehyd zur Kupplung zu bestimmen. Diese Ansätze wurden 2 Stunden bei 0° unter Schütteln inkubiert. Das Mischungsverhältnis, das nach 2 Stunden gerade noch eine leichte Trübung ergab, wurde für die Reaktion des gesamten Ansatzes ausgewählt. Die Kupplung wurde dann entsprechend des Vorversuches ausgeführt.

7.3. Chromatographie über Sepharose 4 B

Säule:	80 x 2.5 cm Ø (Pharmacia, Freiburg)
Auftragsvolumen:	2 ml IgG-Ferritin-Konjugat
Durchflußgeschwindigkeit:	7-8 ml/h
Fraktionsgröße:	4 ml = 70 Tropfen (Ultrorac 7000, LKB, Stockholm)
Elutionsmittel:	VBS-Puffer (pH 7.5) mit 0.02 % NaN_3
Proteindetektion:	Transmissionsmessung bei 280 nm (Uvicord II, LKB, Stockholm)
Registrierung:	2-Kanal-Punktschreiber 6520-4, (LKB)

Der Kupplungsansatz wurde direkt auf die Säule aufgetragen und bei 4° aufgetrennt. Die Fraktionen vor dem zweiten Peak, der

ungekuppeltes Material darstellt, wurden gesammelt. Der erste Peak stellte große Kupplungsaggregate dar, die für die weiteren Untersuchungen ungeeignet waren und verworfen wurden. Die vereinigten Fraktionen (ca.30-60) wurden in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Modell 8 MC', XM-50-Membran) eingengt. Dabei ergab sich durch Präzipitation auf der Membran ein Substanzverlust, der nicht zu vermeiden war. Bis zur Bakterienbeladung wurden diese IgG-Ferritin-Konjugate bei 4° aufbewahrt.

7.4. Beladung von Bakterien mit IgG-Ferritin-Konjugaten (90)

Frisch gezüchtete Bakterien wurden auf eine optische Dichte von 0.8 - 0.9 bei 600 nm in VBS-Puffer pH 7.1 (0°) gebracht. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem VBS-Puffer pH 7.1 wurde die Bakteriendichte auf 1.0 bei ebenfalls 600 nm eingestellt. Das Sediment von 1 ml Bakteriensuspension wurde in 200 µl IgG-Ferritin-Konjugat aufgenommen und zwei Stunden bei 37° im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 15 min. mit 4000 x g abzentrifugiert und zweimal mit VBS-Puffer pH 7.1 gewaschen. Die Bakteriensedimente wurden in kleineren Portionen mit etwa 0.5 mm Durchmesser auf Goldträger oder Kartonplättchen ohne Fixierung und Gefrierschutzmittel (Glycin) in Freon 22 (Schick & Co., Stuttgart-Feuerbach) Schock-eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kontrollen wurde anstelle der IgG-Ferritin-Konjugate unmarkiertes IgG verwendet.

Bei den Bakterienbeladungen nach der indirekten Methode wurden die Bakteriensedimente von 1 ml Suspension im ersten Schritt mit 200 µl unmarkiertem IgG inkubiert und in einem zweiten Schritt mit 200 µl IgG aus anti-Kaninchen-IgG-Antisera von der Ziege (Miles, Elkhart, Ind. USA), die mit Ferritin markiert waren, inkubiert. Im Einzelnen wurde wie oben dargestellt verfahren.

7.5. Gefrierätz-Technik

Beim Einfrieren des Bakteriensedimentes ist es unbedingt erforderlich, den naturgetreuen Zustand der Bakterienzellen zu erhalten, was man als Vitrifikation bezeichnet. Der Grad der Vitrifikation ist abhängig vom Zellwassergehalt, der Größe der Präparate und vor allem von der Einfriereschwindigkeit. Eine ausreichende Gefriereschwindigkeit ist dann erreicht, wenn dem Objekt die Wärmeschneller entzogen wird, als durch freiwerdende Kristallisationswärme nachgeliefert werden kann (96). Durch rasches Eintauchen in Freon 22 wird eine gute Vitrifikation erreicht. Bei Abkühlungsgeschwindigkeiten von mehr als $-1000^{\circ}/\text{sec}$ ist im allgemeinen eine gute Vitrifikation möglich (88). Nach dem Einfrieren enthalten die Präparate sprödes Eis und können deshalb nicht geschnitten werden. Sie müssen gebrochen werden, was in einer Gefrierätzanlage durchgeführt wird. Bei -100° und im Vakuum (5×10^{-6} Torr) wird die auf einem gekühlten Objektisch befindliche Probe durch Vorschub eines Mikrotoms entlang bevorzugter Schwächezonen gebrochen, die bei Biomembranen oft die hydrophoben Mittelzonen sind. Nach dem Aufbrechen wird das Eis 1-2 Minuten an den Bruchrändern bis zu einer Tiefe von wenigen nm wegsublimiert. Für die Sublimation ist ein höherer Wasserdampfdruck in der Probe als im Vakuum erforderlich. Eine Kältefalle am Mikrotom verhindert zusätzlich die Kondensation von Eispartikeln auf der Probe, die sonst falsche Auflagerungen vorweisen könnten. Die durch Aufbrechen und Ätzen freigelegten Strukturen der Bruchflächen werden mit Platin und Kohle bedampft, um einen naturgetreuen Abdruck zu erhalten (s. Abb. 49). Platin, das in einem Winkel von 45° auf das Objekt aufgedampft wird, eignet sich deshalb gut zur Bedampfung, da es eine kontrastreiche, feinkörnige Schicht bildet.

Durch die folgende Aufdampfung von Kohle wird der Platinabdruck mechanisch und chemisch so verfestigt, daß ohne Veränderung des Abdrucks organische Reste des Präparates durch 40%ige Chromsäure abgelöst werden können. Dieser Platin/Kohleabdruck (Replika) wird in destilliertem Wasser ausgiebig gewaschen und auf Objektträger für Elektronenmikroskope übertragen.

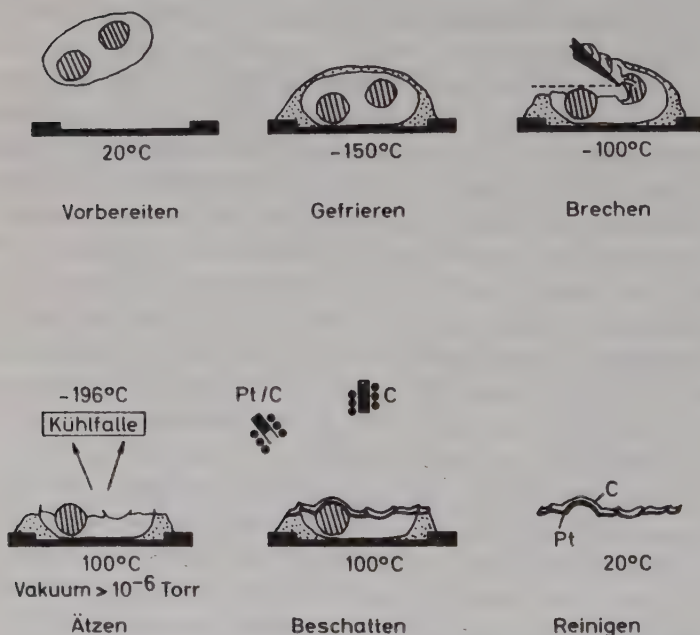


Abb. 49: Präparationsschritte der Gefrierätzung, modifiziert nach Niedermayer (96)

Die Untersuchungen im Elektronenmikroskop (EM 400, Philips, Eindhoven), die Einbettung von Bakteriensedimenten in Epon (68) und die anschließende Mikrotomie zur Herstellung von Ultradünnschnitten wurden von J.R. Golecki, Universität Freiburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie, durchgeführt.

7.6. Beladung von Bakterien mit Fluoreszein-gekuppelten Antikörpern

Diese Beladung erfolgte nur nach der indirekten Methode. Anstelle der Ferritin-markierten Antikörper im zweiten, oben beschriebenen Inkubationsschritt, wurden hier mit Fluoreszein-gekuppelte Antikörper von der Ziege (Miles) eingesetzt (weitere Einzelheiten s. S. 128). Von dem letzten Bakteriensediment wurden 2 µl auf einen Objektträger verbracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nagellack sorgte für eine luftdichte Verbindung zwischen Objektträger und Deckgläschen. Kontrollsedimente erhielten unmittelbar vor dem Auftragen auf den Objektträger 2 µl fluoreszierende Antikörperlösung beige-mischt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss-Ikon-Mikroskop III RS (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Objekte wurden durch das Mikroskop 800-fach (100 x 8) oder 504-fach (64 x 8) vergrößert. Für photographische Aufnahmen wurden Ektachrome 160 Tungsten Filme (Kodak, Stuttgart) eingesetzt. Die Belichtungszeiten dafür lagen je nach Intensität der Fluoreszenz bei automatischer als auch bei manueller Auslösung zwischen 15 sec. und 2 min. Die im Ergebnisteil C.2. dargestellten Abzüge von den Negativen vergrößerten die photographierten Bakterien um den Faktor 6.5.

F. Literaturverzeichnis

1. Ames, G.F., Spudich, L.E.N. and Nikaido, H.:
Protein composition of the outer membrane of Salmonella typhimurium: Effect of lipopolysaccharide mutations.
J.Bacteriol. 117, 406-416, 1974.
2. Anderson, L.E. and McClure, W.D.:
An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power.
Analyt.Biochem. 51, 173-176, 1973.
3. Aoki, S., Merkel, M. and McCabe, W.R.:
Immunofluorescent demonstration of the common enterobacterial antigen.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121, 230-234, 1966.
4. Bader, R.E.:
Ein neuer gemeinsamer Faktor der Typen I bis V von Pasteurella pseudotuberculosis.
Zbl.Bakt.Parasit.Infektionskr.I.Abt.Orig. Reihe A 221, 327-333, 1972.
5. Barber, C. and Eylan, E.:
The unfortunate role of precedent in bacteriology.
I. The main antigens of Salmonellae: The proteins.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A. 234, 53-59, 1976.
6. Bayer, M.E.:
Areas of adhesion between wall and membrane of Escherichia coli.
J.Gen.Microbiol. 53, 395-401, 1968.

7. Bladen, H.A. and Mergenhagen, S.E.:
Ultrastructure of Veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity.
J.Bacteriol. 88, 1482-1492, 1964.
8. Braun, V., Bosch, V., Klumpp, E.R., Neff, I., Mayer, H. and Schlecht, S.:
Antigenic determinants of murein-lipoprotein and its exposure at the surface of Enterobacteriaceae.
Eur.J.Biochem. 62, 555-566, 1976.
9. Braun, V. and Hantke, K.:
Biochemistry of bacterial cell envelope.
Ann.Rev.Biochem. 43, 89-121, 1974.
10. Braun, V. and Rehn, K.:
Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E.coli cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure..
Eur.J.Biochem. 10, 426-438, 1969.
11. Costerton, J.W., Ingram, J.M. and Cheng, K.-J.:
Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria.
Bacteriol. Rev. 38: 87-110, 1974.
12. Dannemann, P.J. and Michael, J.G.:
Reaginic antibody production to protein antigens of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa by mice.
Inf.Imm. 14, 694-702, 1976.
13. Decad, G.M. and Nikaido, H.:
Outer membrane of gram-negative bacteria. XII. Molecular sieving function of cell wall.
J.Bacteriol. 128, 325-336, 1976.

14. Domingue, G.J., Salhi, A., Rountree, C. and Little, W.:
Prevention of experimental hematogenous and retrograde
pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common
antigen.
Infect.Immun. 2, 175-182, 1970.
15. Drews, G., Weckesser, J. and Mayer, H.:
Lipopolysaccharides of photosynthetic bacteria.
In: The Photosynthetic Bacteria , R.Clayton, K.Sistrom and
W. Rieds (eds.), Plenum Press, New York, 1975.
16. Dubois, M., Gilles, K.H., Hamilton, J.K., Rebers, A.A. and
Smith, R.:
Colorimetric method for determination of sugars and related
substances.
Analyt.Chem. 28, 350-356, 1956.
17. Eisenberg, R.C., Yu, L. and Wolin, M.J.:
Masking of Bacillus megaterium KM membrane reduced nicotin-
amid adenine dinucleotide oxidase and solubilization studies.
J.Bact. 102, 161-171, 1970.
18. Feige, U.:
Über den Receptor des Bakteriophagen ϕ X 174.
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Biologie der
Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, 1977.
19. Feige, U., Jann, B., Jann, K., Schmidt, G. and Stirm, S.:
On the primary structure of the Escherichia coli R4 cell
wall lipopolysaccharide core.
Biochem. Biophys. Res.Comm. 79, 88-95, 1977.
20. Feige, U. and Stirm, S.:
On the structure of the Escherichia coli C cell wall lipo-
polysaccharide core and on its ϕ X 174 receptor.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 71, 566-573, 1976.

21. Fleming, H.C.:
Vergleichende analytisch-chemische Untersuchungen an O- und K-Antigenen einiger Vertreter der K-Antigen-Klasse B. Diplom-Arbeit aus dem Institut für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, 1972.
22. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T. and Westphal, O.:
Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component.
In: Inter.Rev.Biochem. of Lipids II , Goodwin, T.W., Baltimore (ed.), Vol. 14, 239-335, University Park Press, 1977.
23. Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.:
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides.
Eur.J.Biochem. 9, 245-249, 1969.
24. Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.:
Preparation and properties of antisera against the lipid A-component of bacterial lipopolysaccharides.
Eur.J.Biochem. 24, 116-122, 1971.
25. Geyer, R.:
Proteine der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Isolierung und Charakterisierung eines Proteins aus Salmonella mit Affinität zu Lipopolysaccharid.
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, 1977.
26. Gitnick, G.L., Arthur, M.H. and Shibata, J.:
Cultivation of viral agents from Crohn's disease.
Lancet II, 215-217, 1976.
27. Glynn, A.A.:
Bacterial factors inhibiting host defense mechanisms.
In: Microbial Pathogenicity in Man and Animals .
Cambridge University Press, 1972.

28. Gmeiner, J. and Martin, H.H.:
Phospholipid and lipopolysaccharide in Proteus mirabilis
and its stable protoplast L-form.
Eur.J.Biochem. 67, 487-494, 1976.
29. Hämmerling, G., Lüderitz, O., Westphal, O. and Mäkelä, P.H.:
Structural investigation on the core polysaccharide of
Escherichia coli O 100.
Eur.J.Biochem. 22, 331-344, 1971.
30. Halegoua, S., Hirashima, A. and Inouye, M.:
Existence of a free membrane lipoprotein in gram-negative
bacteria.
J.Bact. 120, 1204-1208, 1974.
31. Hammarström, S., Carlsson, H.E., Perlmann, P. and Svensson, S.:
Immunochemistry of the common antigen of Enterobacteriaceae
(Kunin).
J.Exp.Med. 134, 565-576, 1971.
32. Hancock, J. and Braun, V.:
The colicin I receptor of Escherichia coli K-12 has a role
in enterocholin-mediated iron-transport.
FEBS Letters 65, 208-210, 1976.
33. Hase, S. and Matsushima, Y.:
Structural studies on a glucose-containing polysaccharide
obtained from Micrococcus lysodeikticus cell walls I.
J.Biochem. 68, 723-730, 1970.
34. Hase, S. and Matsushima, Y.:
Structural studies on a glucose-containing polysaccharide
obtained from Micrococcus lysodeikticus cell wall III. De-
termination of the structure.
J.Biochem. 72, 1117-1128, 1972.

35. Heath, E.C. and Ghalambor, M.A.:
2-Keto-3-deoxy-octonate, a constituent of cell wall lipopolysaccharide preparations obtained from Escherichia coli.
Carbohydr.Res. 8, 43-55, 1968.
36. Hellerqvist, C.G. and Lindberg, A.A.:
Structural studies of the common-core-polysaccharide of the cell-wall lipopolysaccharide from Salmonella 395 MS.
Carbohydr.Res. 16, 39-48, 1971.
37. Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., Svensson, S., Holme, T., and Lindberg, A.A.:
Structural studies on the O-specific side-chains of the cell wall-lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium 395 MS.
Biochem.Biophys. Res.Comm. 10, 340-345, 1968.
38. Henning, U., Höhn, B. and Sonntag, J.:
Cell envelope and shape of Escherichia coli K 12. The ghost membrane.
Eur.J.Biochem. 39, 27-36, 1973.
39. Henning, U., Rehn, K. and Höhn, B.:
Cell envelope and shape of Escherichia coli K-12.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 2033-2036, 1973.
40. Hirschfeld, J.:
Immunoelectrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera.
Science Tools 7, 18-25, 1960.
41. Howard, J.G. and Glynn, A.A.:
The virulence for mice of strains of Escherichia coli related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement.
Immunology 20, 767-777, 1971.

42. Humphrey, J.H. and White, R.G.:
Immunologie
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1971.
43. Ichihara, N., Ishimoto, N., Ito, E.:
Enzymatic incorporation of N-acetyl-D-mannosaminuronic acid
and D-glucose into a polysaccharide of Escherichia coli
O14:K7:H⁻.
FEBS Lett. 40, 309-311, 1974.
44. Inouye, M.:
A three-dimensional molecular assembly model of a lipoprotein
from the Escherichia coli outer membrane.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 2396-2400, 1974.
45. James, R. and Gudas, L.J.:
Cell cycle-specific incorporation of lipoprotein into the
outer membrane of Escherichia coli.
J.Bacteriol. 125, 374-375, 1976.
46. Jann, K. and Westphal, O.:
Microbial polysaccharides.
In: The antigens, Sela, M. (ed.), Vol. III, 1-125,
Academic Press, New York, 1975.
47. Johnson, E.J., Domingue, G.J., Klein, G.D.:
Anatomical locus of the common enterobacterial antigen.
Z.Immunitäts-Forschung 152, 15-20, 1976.
48. Kaback, H.R.:
Transport.
Ann.Rev.Biochem. 39, 561-598, 1970.
49. Kabat, E.A., and Mayer, M.M.:
Experimental Immunochemistry.
2. Ausgabe, Charles C. Thomas (ed.), Springfield, Ill. USA,
1961.

50. Kaijser, B. and Olling, S.:
Experimental hematogenous pyelonephritis due to Escherichia coli in rabbits: The antibody response and its protective capacity.
J.Infect.Dis. 128, 41-49, 1973.
51. Kamio, Y. and Nikaido, H.:
Outer membrane of Salmonella typhimurium: Accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium.
Biochem. 15, 2561-2570, 1976.
52. Kauffmann, F.:
The bacteriology of Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Kopenhagen, 1966.
53. Kauffmann, F. und Vahlne, G.:
Über die Bedeutung der serologischen Formenwechsel für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe.
Acta Pathol. Microbiol.Scand. 22, 119-137, 1945.
54. Kawamura, T., Ichihara, N., Ishimoto, N. and Ito, E.:
Biosynthesis of uridine diphosphate N-acetyl-D-mannosaminuronic acid from uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine in Escherichia coli: separation of enzyme responsible for epimerization and dehydrogenation.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 66, 1506-1512, 1975.
55. Kellenberger, E., Ryter, A. and Sechaud, J.:
Electron microscope study of DNA-containing plasms. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleotids in different physiological states.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4, 671, 1958.

56. Kickhöfen, B. and Warth, R.:
A rapid method for dry weight determination of proteins
on a micro scale with an electrobalance.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 745-749, 1976.
57. Kiss, P.:
Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung unbe-
kannter, Glucosamin-haltiger Makromoleküle der Zellwand
von Salmonella.
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Biologie der
Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, 1975.
58. Kiss, P., Rinno, J., Schmidt, G. and Mayer, H.:
Structural studies on the immunogenic form of the entero-
bacterial common antigen.
Eur.J.Biochem. 88, 211-218, 1978.
59. Kunin, C.M.:
Separation, characterization, and biological significance
of a common antigen in Enterobacteriaceae.
J.Exp.Med. 118, 565-586, 1963.
60. Kunin, C.M., Beard, M.V. and Halmagyi, N.E.:
Evidence for a common hapten associated with endotoxin
fractions of E.coli and other Enterobacteriaceae.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111, 160-166, 1962.
61. Lagercrantz, R., Hammarström, S., Perlmann, P. and
Gustafsson, B.E.:
Immunological studies in ulcerative colitis. IV. Origin of
autoantibodies.
Exp.J.Med. 128, 1339-1352, 1968.

62. Le Minor, L., Chalon, A.-M. and Vêron, M.:
Recherches sur la présence de l'antigène commun des
Enterobacteriaceae (antigène Kunin) chez les Yersinia,
Levinea, Aeromonas et Vibrio.
Ann.Inst.Pasteur Paris 123, 761-774, 1972.
63. Lew, H.C., Nikaido, H. and Mäkelä, P.H.:
The biosynthesis of uridine diphosphate N-acetylmannosamin-
uronic acid in rff mutants of Salmonella typhimurium.
J.Bact. submitted for publication, 1978.
64. Lüderitz, O.:
Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand-Lipopoly-
saccharide von Salmonella-Bakterien.
Angew.Chem. 82, 708-722, 1970.
65. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Mayer, H.,
Rietschel, E.Th. and Weckesser, J.:
Chemical structure and biological activities of lipid A's
from various bacterial families.
Naturwiss. 65, 578-585, 1978.
66. Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. and Nikaido, H.:
Isolation and chemical and immunochemical characterization
of bacterial lipopolysaccharides.
In: Microbial toxins. Weinbaum, G., Kadis, S., Aijl, S.J.(eds.)
Vol. IV, 145-233, Academic Press, New York, 1971.
67. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., v.d.Hoek, P. and
v. Alphen, L.:
Electrophoretic resolution of the major outer membrane
protein of Escherichia coli K-12 into four bands.
FEBS Lett. 58, 254-258, 1975.

68. Luft, J.H.:
Improvements in epoxy resin emmbedding methods.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 9, 409-414, 1961.
69. Mäkelä, P.H., Jahkola, M. and Lüderitz, O.:
A new gene cluster rfe concerned with the biosynthesis of
Salmonella lipopolysaccharide.
J.Gen.Microbiol. 60, 91-106, 1970.
70. Mäkelä, P.H. and Mayer, H.:
Participation of lipopolysaccharide genes in the determination
of the enterobacterial common antigen: analysis in Salmonella
groups B and C.
J.Bacteriol. 119, 765-770, 1974.
71. Mäkelä, P.H. and Mayer, H.:
Enterobacterial common antigen.
Bacteriol. Rev. 40, 591-632, 1976.
72. Mäkelä, P.H., Mayer, H., Whang, H.Y. and Neter, E.:
Participation of lipopolysaccharide genes in the determination
of the common enterobacterial antigen: analysis of R mutants
of Salmonella minnesota.
J.Bacteriol. 119, 760-764, 1974.
73. Maeland, J.A., Digranes, A.:
Common enterobacterial antigen in Yersinia enterocolitica.
Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B 83, 382-386, 1975.
74. Maeland, J.A. and Digranes, A.:
Human serum antibodies against heat-stable antigens from
Yersinia enterocolitica.
Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B 83, 451-456, 1975.

75. Männel, D.:
Isolierung und Charakterisierung des Common Antigen der Enterobacteriaceae.
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, 1976.
76. Männel, D. and Mayer, H.:
Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen.
Eur.J.Biochem. 86, 361-370, 1978.
77. Männel, D. and Mayer, H.:
Serological and immunological properties of isolated enterobacterial common antigen.
Eur.J.Biochem. 86, 371-379, 1978.
78. Malamy, M. and Horecker, B.L.:
The localization of alkaline phosphatase in E. coli K 12.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 5, 104-108, 1961.
79. Martin, H., Maskos, H.C. and Burger, R.:
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase in the bacterial form and L-form of Proteus mirabilis.
Eur.J.Biochem. 55, 465-473, 1975.
80. Marx, A. and Petcovici, M.:
Immunochemical studies on purified common enterobacterial antigen.
Zbl.Bakteriol.Parasitkd.Infektionskr.Hyg.I.Abt.Orig.Reihe A 233, 486-494, 1975.
81. Mayer, H.:
D-Mannosaminuronsäure - Baustein des K7-Antigens von Escherichia coli.
Eur.J.Biochem. 8, 139-145, 1969.

82. Mayer, H., Rapin, A.M.C., Schmidt, G. and Bomann, H.G.:
Immunochemical studies on LPS from wild-type and mutants
of E.coli K-12.
Eur.J.Biochem. 66, 357-368, 1976.
83. Mayer, H. and Schmidt, G.:
Hämagglutinine gegen ein gemeinsames Enterobacteriaceen-
Antigen in E.coli R1-Antiseren.
Zbl.Bakteriol.Parasitenkd.Infektionskr.Hyg. I Abt.Orig.
Reihe A 216, 299-313, 1971.
84. Mayer, H., Schmidt, G., Whang, H.Y. and Neter, E.:
Biochemical basis of the immunogenicity of the common
enterobacterial antigen.
Infect.Immun. 6, 540-544, 1972.
85. Mayer, H. and Schmidt, G.:
The occurrence of three different lipopolysaccharide cores
in Shigella and their relationship to known enterobacterial
core types.
Zbl.Bakteriol.Parasitenkd.Infektionskr.Hyg. I Abt. Orig.
Reihe A 224, 345-354, 1973.
86. Mayer, H. and Schmidt, G.:
Chemistry and biology of the enterobacterial common antigen.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology,
85, Springer-Verlag, Berlin 1979, im Druck.
87. Moor, H., Mühlethaler, K., Waldner, H. and Frey-Wyssling, A.:
A new freezing-ultramicrotome.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 10, 1-13, 1961.
88. Moor, H.:
Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Elektronen-
mikroskopie.
Z.Zellforsch. 62, 546-552, 1964.

89. Mühlradt, P.:
Die Zelloberfläche gram-negativer Bakterien.
Biologie in unserer Zeit, 5. Jahrgang, Nr. 2, 33-40, 1975.
90. Mühlradt, P., Menzel, J., Golecki, J. and Speth, V.:
Outer membrane of Salmonella. Sites of export of newly
synthesized lipopolysaccharide on the bacterial surface.
Eur.J.Biochem. 35, 471-481, 1973.
91. Mühlradt, P., Menzel, J.R., Golecki, J. and Speth, V.:
Lateral mobility and surface density of lipopolysaccharide
in the outer membrane of Salmonella typhimurium.
Eur.J.Biochem. 43, 533-539, 1974.
92. Nakae, T. and Nikaido, H.:
Outer membrane as a diffusion barrier in Salmonella typhimurium.
Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer
membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer.
J.Biol.Chem. 250, 7359-7365, 1975.
93. Nau, H.C. and Heppel, L.A.:
The release of ribonuclease into the medium when Escherhichia
coli cells are converted to spheroplasts.
J.Biol.Chem. 239, 3893-3900, 1964.
94. Neter, E.:
Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bacteriol.Rev.2, 166-188, 1956.
95. Neter, E., Whang, H.Y., Suzuki, T. and Gorzynski, E.A.:
Differences in antibody response of rabbit to intravenously
injected soluble and cell-attached enterobacterial antigen.
Immunology 7, 657-664, 1964.

96. Niedermeyer, W.:
Gefrierätzung.
Biologie in unserer Zeit 6, 178-187, 1977.
97. Nikaido, H.:
Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide and the outer membrane layer of gram-negative cell wall.
In: Bacterial membranes and walls, L.Leive (ed.), Marcel Dekker Inc. New York, 1973.
98. Olson, P.:
A simple technique for the inactivation of IgM-antibodies using dithiothreitol.
Vox.Sang. 30, 149-159, 1976.
99. Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B. and Jann, K.:
Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli.
Bacteriol.Rev. 41, 667-710, 1977.
100. Osborn, M.J., Rick, P.D., Lehmann, V. and Rupprecht, E.:
Structure and biogenesis of the cell envelope of gram-negative bacteria.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 235, 52-63, 1974.
101. Oween, P.W. and Freer, J.H.:
Factors influencing the activity of succinic dehydrogenase in membrane preparations from Micrococcus lysodeikticus.
J.Gen.Microbiol. 60, Xi, 1970.
102. Packard Technical Bulletin Nr. 15, Dezember 1965.

103. Perkins, H.R.:
A polymer containing glucose and aminohexuronic acid isolated from cells walls of Micrococcus lysodeikticus.
Biochem.J. 86, 475-483, 1963.
104. Perlmann, P., Hammarström, S., Lagercrantz, R. and Campbell, D.:
Auto-antibodies to colon in rats and human ulcerative colitis cross reactivity with Escherichia coli O14 antigen.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125, 975-980, 1967.
105. Porath, J. and Ui, N.:
Chemical studies on immunoglobulins. I. A new preparative procedure for γ -globulins employing glycine-rich solvent system.
Biochim.Biophys.Acta 90, 324-333, 1964.
106. Prehm, P., Schmidt, G., Jann, B. and Jann, K.:
The cell wall lipopolysaccharide of Escherichia coli K-12. Structure and acceptor site for O-antigen and other substituents.
Eur.J.Biochem. 70, 171-177, 1976.
107. Reissbrodt, R.:
Das anodisch wandernde thermolabile Antigen (ATA) von gram-negativen Bakterien: Vorkommen, Bildung, Isolierung, Reinigung und Eigenschaften.
Dissertation Prom.A., Martin-Luther-Universität, Halle, 1975.
108. Reissbrodt, R., Kemmer, G. und Seltmann, G.:
Das anodisch wandernde thermolabile Antigen (ATA) von gram-negativen Bakterien: Seine molekulare Heterogenität und seine chemische Zusammensetzung.
Z.Allg.Mikrobiol. 16, 385-394, 1976.
109. Reissbrodt, R., Tschäpe, H. und Seltmann, G.:
The anodically-moving thermolabile antigen (ATA) of gram-negative bacteria: its function as the receptor for F pili.
Z.Allg.Mikrobiol. 16, 39-47, 1976.

110. Rittenhouse, H.G., Heptinstall, J. and McFadden, B.A.:
A hydrophobic protein from the cell envelope of Hydrogenomonas
facilis.
Biochem. 10, 4045-4049, 1971.
111. Rittenhouse, H.G., McFadden, B.A., Shumway, L.K., Heptinstall, J.:
Cell surface protein of Pseudomonas (Hydrogenomonas) facilis.
J.Bacteriol. 115, 330-340, 1973.
112. Rittenhouse, H.G., Rodda, J.B. and McFadden, B.A.:
Immunologic cross-reacting proteins in cell walls of many
bacteria.
J.Bacteriol. 113, 1400-1403, 1973.
113. Salton, M.R.J.:
Molecular Bacteriology.
In: Molecular Bacteriology, Kwapinsky, J.B.G. (ed.), 387-421,
J.Wiley & Sons, New York, 1974.
114. Sanderson, K.B. and Hartman, P.E.:
Linkage map of Salmonella typhimurium.
Ed. V. Microbiol.Rev. 42, 471-519, 1978.
115. Schlecht, S., Ring, K., Kutscher, J. und Eschweiler, W.:
Ein neuer Laboratoriumsfermenter zur Züchtung von Mikroorganismen
im turbitostatischen, chemostatischen und "batch"-Verfahren.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig. A. 206, 246-258, 1968.
116. Schmidt, G.:
Basalstrukturen von verschiedenen Lipopolysacchariden ver-
schiedener Enterobacteriaceen. Genetische und serologische
Untersuchungen an R-Mutanten.
Zbl.Hyg.I.Abt.Orig.A. 220, 472-476, 1972.

117. Schmidt, G., Fromme, I. und Mayer, H.:
Immunochemical studies on core lipopolysaccharides of Enterobacteriaceae of different genera.
Eur.J.Biochem. 14, 357-366, 1970.

118. Schmidt, G., Jann, B. and Jann, K.:
Immunochemistry of R lipopolysaccharides of Escherichia coli.
Different core regions in the lipopolysaccharides of group O8.
Eur.J.Biochem. 10, 501-510, 1969.

119. Schmidt, G., Jann, B. and Jann, K.:
Genetic and immunochemical studies on Escherichia coli O14:K7:H⁻.
Eur.J.Biochem. 42, 303-309, 1974.

120. Schmidt, G., Männel, D., Mayer, H., Whang, H.Y. and Neter, E.:
The role of a lipopolysaccharide gene for immunogenicity of the enterobacterial common antigen.
J.Bacteriol. 126, 579-586, 1976.

121. Schmidt, G., Mayer, H. and Mäkelä, P.H.:
Presence of rfe genes in Escherichia coli: their participation in biosynthesis of O antigen and enterobacterial common antigen.
J.Bacteriol. 127, 755-762, 1976.

122. Schnaitmann, C.A.
Outer membrane proteins of Escherichia coli. II. Heterogeneity of major outer membrane polypeptides.
Arch.Biochem.Biophys. 157, 553-560, 1973.

123. Schnaitmann, C.A.
Outer membrane proteins of Escherichia coli. III. Evidence that the major proteins of E.coli O 111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species.
J.Bacteriol. 118, 442-453, 1974.

124. Schwarz, M.:
Integration of the receptor for bacteriophage lambda in the
Outer membrane of Escherichia coli: coupling with cell division
J.Bacteriol. 122, 295-301, 1975.
125. Seltmann, G.:
Untersuchungen zur Antigenstruktur von Shigellen. IV. Isolierung
und Reinigung eines thermolabilen Antigens von Sh.sonnei.
Zbl.Bakt.Parasitenkd.Infektionskr.Hyg.I.Abt.Orig.Reihe A 219,
324-335, 1971.
126. Seltmann, G. und Reissbrodt, R.
Das anodisch wandernde thermolabile Antigen (ATA) von gram-
negativen Bakterien: Sein Vorkommen in Rahmutanten von
Shigella flexneri und Escherichia coli.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 231, 122-125, 1975.
127. Seltmann, G. und Reissbrodt, R.:
Reinigung eines thermolabilen, in gram-negativen Bakterien
vorkommenden Antigens (ATA) mit Hilfe der Affinitätschromato-
graphie.
Z.Allg.Mikrobiol. 14, 237-239, 1976.
128. Simmons, D.A.R.:
Immunochemistry of Shigella flexneri O antigens: a study
of structural and genetic aspects of the biosynthesis of cell-
surface-antigens.
Bacteriol.Rev. 35, 117-148, 1971.
129. Smit, J., Kamio, Y. and Nikaido, H.:
Outer membrane of Salmonella typhimurium: chemical analysis
and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants.
J.Bacteriol. 124, 942-958, 1975.

130. Springer, E.L. and Roth, I.L.:
The ultrastructure of the capsules of Diplococcus pneumoniae
and Klebsiella pneumoniae stained with ruthenium red.
J.Gen.Microbiol. 74, 21-31, 1973.
131. Stocker, B.A.D. and Mäkelä, P.H.:
Genetic aspects of biosynthesis and structure of Salmonella
lipopolysaccharide.
In: Microbial toxins. Weinbaum, G., Kadis, S. and Aijl, S.J.
(eds.), Vol. V, 369-438, Academic Press, New York, 1971.
132. Strominger, J.L. and Tipper, D.J.
Bacterial cell wall.
In: Comprehensive Biochemistry 26A, 53-109, 1968.
133. Suzuki, T., Gorzynski, E.A. and Neter, E.:
Separation by ethanol of common and somatic antigens of
Enterobacteriaceae.
J.Bacteriol. 88, 1240-1243, 1964.
134. Suzuki, T., Whang, H.Y., Gorzynski, E.A. and Neter, E.:
Inhibition by lipopolysaccharide (endotoxin) of antibody
response of rabbit to common antigen of Enterobacteriaceae.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 117, 785-789, 1964.
135. Torti, S.V. and Park, J.T.:
Lipoprotein of gram-negative bacteria is essential for growth
and division.
Nature 263, 323-326, 1976.
136. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, J.S.:
Detection of sugars on paper chromatograms.
Nature 166, 444-445, 1950.

137. Tsuchiya, T., Fukazawa, Y., Shinoda, T. and Okoshi, T.:
Response and specificity of anti-Shigella rabbit antibody.
J.Immunol. 98, 1085-1092, 1967.

138. Valtonen, M.V., Larinkari, U.M., Plosila, M., Valtonen, V.V.
and Mäkelä, P.H.:
Effect of enterobacterial common antigen on mouse virulence
of Salmonella typhimurium.
Infect.Immun. 13, 1601-1605, 1976.

139. Wagner, M. und Wagner, B.:
Glutaraldehyd als Kupplungsagens für die Herstellung
Ferritin-markierter Antikörper.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 221, 100-105, 1972.

140. Wagner, B., Wagner, M., Reissbrodt, R. and Seltmann, G.:
Die Lokalisation des anodisch wandernden thermolabilen Anti-
gens (ATA) von gram-negativen Bakterien mit ferritinmarkierten
Antikörpern.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig. A. 240, 517-524, 1978.

141. Weckesser, J., Drews, G. und Mayer, H.:
Lipopolysaccharide aus Zellwänden photosynthetischer
Prokaryonten. Bedeutung für Fragen der Taxonomie und der
endotoxischen Aktivität.
Naturwiss.Rundschau 30, 360-364, 1977

142. Weichselbaum, T.E.:
An accurate and rapid method for the determination of proteins
in small amounts of blood serum and plasma.
Amer.J.Clin.Pathol.Tech.Sect. 10, 40-46, 1946.

143. Weigand, R.A., Vinci, K.D. and Rothfield, L.:
Morphogenesis of the bacterial division septum: a new class
of septation-defective mutants.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 1882-1886, 1976.

144. Westphal, O., Lüderitz, O. und Bister, F.:
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z.Naturforsch. 7b, 148-155, 1952.

145. Whang, H.Y., Lüderitz, O., Westphal, O. and Neter, E.:
Inhibition by lipid A of formation of antibodies against
common antigen of Enterobacteriaceae.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 120, 371-374, 1965.

146. Whang, H.Y. and Neter, E.:
Immunochemical studies of a heterogenetic enterobacterial
antigen (Kunin).
J.Bacteriol. 84, 1245-1250, 1962.

147. Whang, H.Y. and Neter, E.:
Antigen-associated immunosuppressant: effect of serum on
immune response.
Science 163, 290-291, 1969.

148. Whang, H.Y. and Neter, E.:
The common antigen of Enterobacteriaceae and its value in
taxonomy.
ASM Meeting, Abstract M80, 1972.

149. Whang, H.Y., Mayer, H., Schmidt, G. and Neter, E.:
Strain-related differences in immunosuppressive effects of
Enterobacteriaceae and their lipopolysaccharides on production
in rabbits of antibody to enterobacterial common antigen.
Infect.Immun. 13, 1074-1079, 1976.

150. Whang, H.Y., Yagi, Y. and Neter, E.:
Characterization of rabbit antibodies against common bacterial
antigens and their presence in the fetus.
Int.Arch.Allergy 32, 353-365, 1967.

151. Wilkinson, F.F.:

The extracellular polysaccharides of bacteria.

Bacteriol.Rev. 22, 46-73, 1958.

152. Wu, T.C.M. and Park, J.T.:

Chemical characterization of a new surface antigenic polysaccharide from a mutant of Staphylococcus aureus.

J.Bacteriol. 108, 874-884, 1971.

Lebenslauf

Am 15. September 1944 wurde ich als Sohn des Otto Rinno und seiner Frau Ursula, geb. Wernitz, in Stolp/Pommern geboren.

Der Besuch der Volksschule in Rostock wurde 1955 durch die Flucht aus der DDR unterbrochen und in Frankfurt 1956 beendet. Am 26.6.1967 legte ich die Reifeprüfung am naturwissenschaftlichen Goethe-Gymnasium in Frankfurt/Main ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Veterinär-Medizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Am 4.9.1974 bestand ich die Tierärztliche Prüfung und erhielt am 11.9.1974 die Approbation.

Von Januar bis Oktober 1975 übernahm ich Vertretungen von tierärztlichen Praxen.

Vom 1. Oktober 1975 bis Ende November 1978 war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg i.Br. beschäftigt.

